

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
und dem Institut für Biochemie und Endokrinologie  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Sekretion von endogenem „Digitalis“ und Corticosteroiden  
aus bovinen Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Martina Ullrich**

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
und dem Institut für Biochemie und Endokrinologie  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. Petzinger und Prof. Dr. W. Schoner

**Sekretion von endogenem „Digitalis“ und Corticosteroiden  
aus bovinen Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Martina Ullrich**  
Tierärztin aus Köln

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

---

1.     Berichterstatter:     Prof. Dr. E. Petzinger und Prof. Dr. W. Schoner
2.     Berichterstatter:     PD Dr. J. Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2005

In Liebe, Achtung und Dankbarkeit  
meinen Eltern und Großeltern,  
meinem Peter,  
unserer Ulla und unserer Paula.

*...Ett Lääve jeet wigger...*

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zielsetzung</b>	<b>2</b>
 <b>2. Literaturübersicht</b>	
<b>2.1 Herzglykoside</b>	<b>3</b>
2.1.1 Geschichte der Herzglykoside in Pflanzen und Säugetieren	3
2.1.2 Herzglykoside in Pflanzen	8
2.1.2.1 Chemie der Herzglykoside	8
2.1.2.2 Vorkommen in Pflanzen	12
2.1.2.3 Biosynthese von Herzglykosiden in Pflanzen	14
2.1.3 Herzglykoside in niederen Tierspezies	16
2.1.4 Herzglykoside in Säugetieren	18
2.1.4.1 Pharmakokinetik der Herzglykoside	18
2.1.4.2 Pharmakodynamik der Herzglykoside	21
2.1.4.2.1 Aufbau und Physiologie der Natriumpumpe	21
2.1.4.2.2 Die Natriumpumpe als Rezeptor für Herzglykoside	23
2.1.4.3 Physiologie und Pathophysiologie des Ouabains	27
2.1.4.4 Biosynthese der Herzglykoside im Säuger	31
2.1.4.4.1 Biosynthese der Herzglykoside in Nebennierenrindenzellen <i>in-vitro</i>	33
2.1.4.5 Stimulierung der Freisetzung von Herzglykosiden	37
<b>2.2 Steroidhormone</b>	<b>40</b>
2.2.1 Glucocorticoide	41
2.2.2 Geschichte der Glucocorticoide	42
2.2.3 Biosynthese des Cortisols	43
2.2.4 Die Ausschleusung des Cortisols aus der Nebennierenrindenzelle	46
2.2.5 Regulation der Freisetzung und Biosynthese des Cortisols	47
 <b>3. Material</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Versuchsorgane und Zelllinien</b>	<b>49</b>
3.1.1 Versuchsorgane	49
3.1.2 Die PC12-Zelllinie	49
3.1.3 Die humane Nebennierenrinden-Zelllinie (NCI-295R)	49
<b>3.2 Präparationsausstattung</b>	<b>50</b>
3.2.1 Material und Geräte	50
3.2.2 Chemikalien und Enzyme	50
3.2.3 Pufferlösungen	51

	Seite
3.2.4 Chemikalien	52
<b>3.3 Zellkulturbedarf</b>	<b>52</b>
3.3.1 Material und Geräte	52
3.3.2 Chemikalien und Enzyme	53
3.3.3 Kulturmedien und -zusätze	53
3.3.4 Kulturmedienzusammensetzung für bovine Nebennierenrinden- und bovine Nebennierenmarkzellen	53
3.3.5 Kulturmedienzusammensetzung für PC12-Zellen	54
<b>3.4 ELISA</b>	<b>54</b>
3.4.1 Material und Geräte	54
3.4.2 Chemikalien und Enzyme	55
3.4.3 Pufferlösungen	55
<b>3.5 Durchflusszytometrische Untersuchung</b>	<b>56</b>
 <b>4. Methoden</b>	 <b>57</b>
<b>4.1 Präparation von bovinen NNRZ</b>	<b>57</b>
<b>4.2 Präparation von bovinen NNMZ</b>	<b>61</b>
<b>4.3 Erstellen des Percoll-Dichtegradienten</b>	<b>63</b>
<b>4.4 Bestimmung des Proteingehaltes</b>	<b>64</b>
<b>4.5 Bestimmung der Vitalität und endokrinologischen Aktivität von primären bovinen NNRZ</b>	<b>64</b>
4.5.1 Durchflusszytometrie mit präparierten bovinen NNRZ	64
4.5.2 Bestimmung des Gehaltes an LDH in der Zellsuspension	65
<b>4.6 Kultivierung der primären bovinen Nebennierenrindenzellen, der primären bovinen Nebennierenmarkzellen und der PC12-Zelllinie</b>	<b>66</b>
4.6.1 Kultivierung der primären bovinen NNRZ	66
4.6.2 Kultivierung der primären bovinen NNMZ	66
4.6.3 Kultivierung der PC12-Zelllinie	66
<b>4.7 Messung des Ouabain- und Cortisolgehaltes sowohl im Zellüberstand als auch intrazellulär in bovinen NNRZ in Suspension</b>	<b>67</b>

	Seite
<b>4.8 Messung sowohl der Freisetzung als auch der intrazellulären Gehalte an Ouabain und Cortisol in Primärzellkulturen boviner NNRZ, NNMZ und Zellen der PC12-Zelllinie</b>	<b>68</b>
4.8.1 Messung des Ouabain- und Cortisolgehaltes sowohl im Zellüberstand als auch intrazellulär an Primärzellkulturen boviner NNRZ	68
4.8.2 Messung des Ouabain- und Cortisolgehaltes sowohl im Zellüberstand als auch intrazellulär an Primärzellkulturen boviner NNMZ	69
4.8.3 Messung des Ouabain- und Cortisolgehaltes sowohl im Zellüberstand als auch intrazellulär an Zellen der PC12-Zelllinie	70
<b>4.9 Probenaufbereitung</b>	<b>70</b>
4.9.1 Vorbereitung der Zellkulturflaschen zur Bestimmung der intrazellulären Ouabain- und Cortisolkonzentration sowie der Proteinkonzentration	70
4.9.2 Eluierung des Ouabains aus dem Zellüberstand sowie aus dem Zelllysate	71
 <b>5. Detektion des eluierten Ouabains mittels ELISA-Verfahren</b>	 <b>72</b>
5.1 Prinzip des verwendeten ELISA-Verfahrens	72
5.2 Arbeitsschritte des verwendeten ELISA-Verfahrens	73
5.3 Pipettierschema zur Analyse unbekannter Konzentrationen an Ouabain	76
5.4 Kontrolle der verwendeten Reinigungsmethode zur Ouabaindetektion	77
 <b>6. Statistische Auswertungsverfahren</b>	 <b>78</b>
6.1 Kurvenanpassung und Bestimmung der halbmaximalen Sättigung der Steroidsynthese bzw. –freisetzung aus Vorläuferverbindungen	79
 <b>7. Ergebnisse</b>	 <b>81</b>
7.1 Morphologie isolierter boviner NNRZ und NNMZ	81
7.1.1 Lichtmikroskopische Darstellung von bovinen NNRZ in Suspension	81

	Seite
7.1.2 Lichtmikroskopische Darstellung von bovinen NNRZ in Kultur	81
7.1.3 Lichtmikroskopische Darstellung von bovinen NNMZ in Suspension	82
7.1.4 Lichtmikroskopische Darstellung von bovinen NNMZ in Kultur	83
7.1.5 Lichtmikroskopische Darstellung von Zellen der PC12-Zelllinie in Kultur	83
<b>7.2 Freisetzung von Cortisol aus NNRZ des Rindes in den Zellüberstand</b>	<b>84</b>
7.2.1 Vergleich zwischen der Cortisolfreisetzung aus NNRZ in Suspension und in Kultur	84
7.2.2 Sekretionsrate für Cortisol in Abhängigkeit vom Alter der Zellkultur	87
<b>7.3 Freisetzung von Ouabain aus NNRZ des Rindes in den Zellüberstand</b>	<b>88</b>
7.3.1 Vergleich zwischen der Ouabainfreisetzung aus NNRZ in Suspension und in Kultur	88
<b>7.4 Bestimmung der intrazellulären Konzentration an Ouabain und Cortisol in NNRZ</b>	<b>90</b>
<b>7.5 Untersuchung der Ouabainsynthese in primären NNMZ und Zelllinien</b>	<b>92</b>
7.5.1 Untersuchungen an primären NNMZ	92
7.5.2 Untersuchungen an Zellen der PC12-Zelllinie	93
7.5.3 Untersuchungen an einer humanen NNRZ-Linie (NCI-295R)	94
<b>7.6 Energieabhängigkeit der Freisetzung und Biosynthese von Cortisol aus bovinen NNRZ</b>	<b>95</b>
7.6.1 Energieabhängigkeit der <i>Freisetzung</i> von Cortisol aus Rinder-NNRZ in <i>Suspension</i>	97
7.6.2 Energieabhängigkeit der <i>Freisetzung</i> von Cortisol aus Rinder-NNRZ in <i>Kultur</i>	100
7.6.3 Energieabhängigkeit der <i>Biosynthese</i> von Cortisol durch Rinder-NNRZ in <i>Suspension</i>	102
7.6.4 Energieabhängigkeit der <i>Biosynthese</i> von Cortisol durch Rinder-NNRZ in <i>Kultur</i>	103
<b>7.7 Vergleich der stimulierenden Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Sekretion bzw. Biosynthese von Cortisol und Ouabain</b>	<b>104</b>
7.7.1 Stimulierende Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Freisetzung von Cortisol	105



	<b>Seite</b>
7.7.2 Stimulierende Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Freisetzung von Ouabain	106
7.7.3 Stimulierende Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Biosynthese von Cortisol	107
7.7.4 Stimulierende Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Biosynthese von Ouabain	108
7.7.5 Zusammenfassung der Studien 7.7.1 bis 7.7.4	109
 <b>7.8 Pregnenolon und Progesteron: Zwischenstufen in der Biosynthese von Ouabain und Cortisol in NNRZ?</b>	 <b>111</b>
7.8.1 Wirkung von Pregnenolon und Progesteron auf die ACTH-stimulierte Freisetzung von Cortisol	113
7.8.2 Wirkung von Pregnenolon und Progesteron auf die ACTH-stimulierte Freisetzung von Ouabain	116
7.8.3 Konzentrationsabhängigkeit, Sättigung und ACTH-Einfluss der stimulierenden Wirkung von Pregnenolon und Progesteron auf die <i>Freisetzung</i> von Cortisol und Ouabain	118
7.8.4 Wirkung von Pregnenolon und Progesteron auf die <i>Biosynthese</i> von Cortisol und Ouabain	124
 <b>7.9 Corticosteron, Aldosteron, Digoxin, Digitoxigenin und Ouabain als Biosynthesevorstufen von Ouabain bzw. Cortisol</b>	 <b>127</b>
7.9.1 Cortisol- und Ouabainfreisetzung und –biosynthese unter Corticosteron, Aldosteron und Metyrapon	127
7.9.2 Beeinflussung der Cortisolfreisetzung und –biosynthese durch Ouabain und Digoxin	135
7.9.3 Beeinflussung der Cortisolfreisetzung und –biosynthese durch Digitoxigenin	138
 <b>8. Diskussion</b>	 <b>140</b>
8.1 Sekretionsverhalten von NNRZ von Rindern in Suspension und in Kultur	140
8.2 Intrazelluläre Ouabain- und Cortisolgehalte in Rinder-NNRZ	141
8.3 Energieabhängigkeit der Cortisolfreisetzung aus Rinder-NNRZ	142
8.4 ACTH und Angiotensin II unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die Regulation von Cortisol und Ouabain in Rinder-NNRZ	143

	<b>Seite</b>
<b>8.5    Pregnenolon und Progesteron als Biosynthesevorstufen von Ouabain</b>	<b>146</b>
<b>8.6    Cortisol- und Ouabainproduktion durch Corticosteron und Aldosteron</b>	<b>149</b>
<b>8.7    Ouabainsynthese und die Frage nach der Existenz einer 11<math>\alpha</math>- oder 11<math>\beta</math>- Hydroxygruppe im endogenen Ouabain der Säuger</b>	<b>149</b>
<b>8.8    Vergleich der Wirkung von Ouabain und seinen direkten Strukturverwandten auf die Cortisol-Produktion</b>	<b>150</b>
<b>8.9    Ausblick</b>	<b>153</b>
 <b>9.      Zusammenfassung</b>	 <b>154</b>
 <b>10.     Summary</b>	 <b>156</b>
 <b>11.     Literaturverzeichnis</b>	 <b>157</b>

## Abkürzungen

ABC	ATP-binding-cassette-transport protein
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ang	Angiotensin II
AT <sub>2</sub>	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bovine adrenocortical cells
BHA	Butylated Hydroxyanisol
bov.	bovin
V <sub>max</sub>	Maximale Bindungsmenge
BSP	Bromosulphophthalein oder Sulfobromophthalein
C <sub>x</sub> -Atom	Atom in Position C3
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CCCP	Carbonal-Cyanid-m-Chlorophenyl-hydrazon
c-fos	Transkriptionsfaktor
cGMP	cyclo-Guanosinmonophosphat
CH <sub>3</sub>	Methylgruppe
c-jun	Transkriptionsfaktor
Cl <sup>-</sup>	Chlor-Ion
cm	Zentimeter
CRH	Corticotropin-releasing hormone
CSA	Cyclosporin A
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DHEA	Dehydroepiandrostenon
DLF	endogenous digitalis-like factor
DLIA	digoxin- and ouabain-like immunoreactivity
DLIF	digoxin-like immunoreactive factors
DLIS	digoxin-like immunoreactive substances
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Deoxycortisol
EDLF	endogenous digitalis-like factors
EDLS	endogenous digitalis like Substances
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylen-Bis-(Oxythylennitrol)-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EO	endogenous ouabain
et. al.	et alii
Fab	Antigen bindendes Fragment
FAB	Fast Atom Bombardement
FKS	Fetales Kälberserum
Fmol	Femtomol
g/L	Gramm pro Liter
Grb2	Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindungsprotein
H	Wasserstoff

H	Stunde
<sup>1</sup> H-NMR	Kernresonanzspektroskopie
Ham F12	Ham's nutrient mixture F12
HeLa	Zellen, die von einem malignen Uterus-Carcinom stammen und einer Frau namens <i>Henrietta Lacks</i> entnommen worden waren
HIF	hypothalamic Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase inhibitory factor
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Selenige Säure
HVL	Hypophysen-Vorderlappen
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale Hemmkonzentration
IgG	Immunglobulin G
InsP3-R	Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>i</sub> -Wert	Inhibitionskonstante, gibt die Konzentration eines Inhibitors für eine halbmaximale Hemmung (hier der Natriumpumpe) an
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante, hier als halbmaximale Sättigungskonzentration eines Substrates zur Stimulation der Steroidfreisetzung bzw. -biosynthese
K <sub>S</sub>	Substratkonstante (Stoffkonzentration der Biosynthese-Vorstufe von Ouabain bzw. Cortisol, bei der die Cortisol- bzw. Ouabainfreisetzung mit halbmaximaler Geschwindigkeit abläuft)
L bzw. l	Liter
LC-ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar
Mg	Milligramm
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPK-ERK, MEK	Aktivierende Kinasen
MDR	Multi-drug-resistance
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
MM	Millimolar
Mosmol	Milliosmol
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Micromolar
µm	Micrometer
µmol/L	Micromol pro Liter
N	Stichprobenumfang
N	Normal
Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher	Natrium-Calcium-Austauscher

NADH / NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumdihydrogencarbonat
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase, primär aktive Pumpe
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Transkriptionsfaktor
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
NM	Nanomolar
nmol/L	Nanomol pro Liter
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
NNM	Nebennierenmark
NNMZ	Nebennierenmarkzellen
NNR	Nebennierenrinde
NNRZ	Nebennierenrindenzellen
OAT	Organic Anion Transporter
Oatp/OATP	Organic anion transporting polypeptide
ODC	ouabain-displacing compound
OH	Hydroxyl- bzw. Alkoholische Gruppe
OLC	ouabain-like compound
OLF	ouabain like factor
OLM	ouabain-like material
OLS	ouabain-like substance
P	Statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
pH-Wert	Pondus hydrogenii
pmol/mg	Pikomol pro Milligramm
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
P <sub>O/W</sub>	Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser
PST 2238	17 beta-(3-furyl)-5 beta-androstane-3 beta, 14 beta, 17 alpha-triol (Digitoxigenin-Derivat)
Raf	Protoonkogen-aktivierender Faktor
Ras	Protoonkogen P21
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of Means
SER	Sarkoplasmatisches/endoplasmatisches Retikulum
s.o.	Siehe oben
SOC	Spannungsabhängiger Calciumkanal
sog.	Sogenannte
Shc, Src	Homologe kollagenartige Proteine
SOS	Son of sevenless
StAR	Steroid acute regulatory protein
Std.	Stunde
s.u.	Siehe unten
TBS	Tris buffered saline
TFA	Trifluoressigsäure
U/l	Units pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute
v.Chr.	Vor Christi Geburt

## Abkürzungsverzeichnis

---

Vgl.	Vergleiche
$V_{\max}$	Maximale Transportgeschwindigkeit
Z.	Zona
z.B.	Zum Beispiel
ZF	Zona fasciculata
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Abbildungsverzeichnis

	<b><u>Literaturübersicht</u></b>	<b>Seite</b>
<b>Abb. 1</b>	Strukturformel des Herzglykosids Ouabain (synonym g-Strophanthin), ein Cardenolid	<b>9</b>
<b>Abb. 2</b>	Vergleich der Strukturformeln der beiden Herzglykoside Ouabain und Digoxin	<b>9</b>
<b>Abb. 3</b>	Strukturisomere des Herzglykosids Ouabain	<b>10</b>
<b>Abb. 4a</b>	Laktonring der Cardenolide	<b>10</b>
<b>Abb. 4b</b>	$\alpha$ -Pyron-Ring (Pentadienolid-Ring) der Bufadienolide	<b>10</b>
<b>Abb. 5a</b>	Frühlingsadonisröschen, Adonis vernalis	<b>12</b>
<b>Abb. 5b</b>	Roter Fingerhut, Digitalis purpurea	<b>12</b>
<b>Abb. 6</b>	Cardenolid-Biosynthese in Digitalis lanata Gewebe mit den bisher bekannten Enzymen (modifiziert nach Stuhlemmer und Kreis, 1996, und Schneider, G., 1985 [1, 2], Perrin et al., 1997 und Lichtstein et al., 1998 [3, 4])	<b>15</b>
<b>Abb. 7</b>	Grundstruktur herzwirksamer Glykoside (Cardenolide)	<b>19</b>
<b>Abb. 8</b>	Übersicht über die Pharmakokinetik des Ouabains im Säugetierorganismus	<b>20</b>
<b>Abb. 9</b>	Die Natriumpumpe als Signaltransducer, und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Herzmuskelzelle und das Herz (modifiziert nach Xie und Askari, 2002 [5]; Xie und Cai, 2003 [6]; Scheiner-Bobis und Schoner, 2001 [7])	<b>25</b>
<b>Abb. 10</b>	Biosynthese von Cardenoliden in Pflanzen nach Stuhlemmer und Kreis, 1996 [1] sowie Schneider, 1985 [2]	<b>35</b>
<b>Abb. 11</b>	Cortisols (Hydrocortison, $C_{21}H_{30}O_5$ ), ein Glucocorticoid	<b>41</b>
<b>Abb. 12</b>	Vereinfachtes Schema der Biosynthese des Cortisols	<b>44</b>
<b>Abb. 13</b>	Übersicht über die Steroidogenese adrenocorticaler Hormone und die daran beteiligten Enzyme	<b>45</b>
<b>Abb. 14</b>	Hypothalamus-hypophyseo-adrenaler Regelkreis der Cortisolbiosynthese und -freisetzung	<b>47</b>
	<b><u>Material und Methoden</u></b>	
<b>Abb. 15</b>	Blutversorgungssystem der Nebenniere, schematisch (nach Kristić, 1984 [8])	<b>58</b>
<b>Abb. 16</b>	Modell des rezirkulierenden Perfusionssystems	<b>59</b>
<b>Abb. 17</b>	Bandenbildung nach Percoll-Dichtegradientenzentrifugation	<b>61</b>
<b>Abb. 18</b>	Nebenniere in ihrer Fettkapsel	<b>62</b>
<b>Abb. 19</b>	Nebenniere nach grobem Entfernen von Fett- und Bindegewebe und retrograder Katheterisierung durch die Vena centralis	<b>62</b>
<b>Abb. 20</b>	Katheterisierte und mit multiplen Inzisionen versehene Nebennierenkapsel zweier Organe während des Spülvorganges	<b>62</b>
<b>Abb. 21</b>	Nebennieren während der Kollagenase-Einwirkung	<b>62</b>
<b>Abb. 22</b>	Längs gespaltene Nebenniere nach gelungenem Kollagenaseverdau	<b>62</b>
<b>Abb. 23</b>	NNRZ in Suspension vor und nach Zentrifugation im Percoll-Dichtegradienten	<b>62</b>
<b>Abb. 24</b>	Standardkurve des ELISA im Bereich von $10^{-7}$ M bis $10^{-12}$ M Ouabain	<b>73</b>

	Seite
<b>Abb. 25</b>	Michaelis-Menten-Kinetik des Substrat-Transportes als Modell für die Berechnung einer Kurvenanpassung <span style="float: right;"><b>80</b></span>
<b><u>Ergebnisse</u></b>	
<b>Abb. 26</b>	NNRZ als Einzelzellen in Suspension, 6 Std. nach der Präparation <span style="float: right;"><b>81</b></span>
<b>Abb. 27</b>	NNRZ in Kultur, 26 Std. nach der Präparation <span style="float: right;"><b>81</b></span>
<b>Abb. 28</b>	NNMZ in Suspension, 6 Std. nach der Präparation <span style="float: right;"><b>82</b></span>
<b>Abb. 29</b>	NNMZ in Kultur, 26 Std. nach der Präparation <span style="float: right;"><b>83</b></span>
<b>Abb. 30</b>	Zellen der PC12-Zelllinie, 6 Tage nach Beginn der Kultivierung bzw. nach dem Splitten der Zellpopulation einer Zellkulturflasche <span style="float: right;"><b>83</b></span>
<b>Abb. 31</b>	Cortisolgehalt im Suspensionspuffer von Rinder NNRZ <span style="float: right;"><b>84</b></span>
<b>Abb. 32</b>	Bestimmung des Cortisolgehaltes im Zellüberstand von bovinen NNRZ, über eine 16-stündige Inkubationszeit gemessen <span style="float: right;"><b>85</b></span>
<b>Abb. 33</b>	Messung des Cortisolgehaltes im Zellüberstand während Langzeitkultivierung von bovinen NNRZ (über mindestens 5 Tage hinweg) <span style="float: right;"><b>86</b></span>
<b>Abb. 34</b>	Bestimmung der Cortisolsekretionsrate von bovinen NNRZ bei 4-stündiger Akkumulationsphase und einem Gesamtinkubationszeitraum von 92 Stunden <span style="float: right;"><b>87</b></span>
<b>Abb. 35</b>	Ouabaingehalt im Zellüberstand von NNRZ des Rindes in Suspension nach 4- bzw. 8-stündiger Inkubation <span style="float: right;"><b>88</b></span>
<b>Abb. 36</b>	Ouabaingehalt im Zellüberstand von bovinen NNRZ nach vorheriger 16-stündiger Phase der Kultivierung zwecks Anpassung der Zellen an die Kulturbedingungen und anschließender Messung des Ouabaingehaltes im Zellüberstand nach 8-stündiger Kultivierung <span style="float: right;"><b>89</b></span>
<b>Abb. 37ab</b>	<b>Abb. 37a:</b> Proportionalität der Proteinkonzentration zur eingestellten Zelldichte bei konstantem Suspensionsvolumen <span style="float: right;"><b>90</b></span>
	<b>Abb. 37b:</b> Ouabainkonzentration lysierter NNRZ in konstantem Suspensionsvolumen als Funktion der Zelldichte <span style="float: right;"><b>90</b></span>
<b>Abb. 38</b>	Intrazellulärer Ouabaingehalt in Rinder-NNRZ nach 8-stündiger Inkubation mit ACTH (1 $\mu$ M) und Pregnenolon (1 $\mu$ M) <span style="float: right;"><b>91</b></span>
<b>Abb. 39</b>	Ouabaingehalt im Zellüberstand von primären NNMZ in Kultur <span style="float: right;"><b>93</b></span>
<b>Abb. 40</b>	Ouabaingehalt im Zellüberstand von Zellen der PC12-Zelllinie <span style="float: right;"><b>94</b></span>
<b>Abb. 41</b>	Antimycin A, Oligomycin, Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) und Cyclosporin A (CSA) verursachen durch Hemmung der ATP-Synthese einen zellulären Energiemangel <span style="float: right;"><b>96</b></span>
<b>Abb. 42</b>	Antimycin A hemmt die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion von Rinder-NNRZ in Suspension über 120 Minuten hinweg <span style="float: right;"><b>97</b></span>
<b>Abb. 43</b>	Oligomycin (25,8 $\mu$ M) hemmt die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion aus Rinder-NNRZ in Suspension über 120 Min. hinweg <span style="float: right;"><b>98</b></span>
<b>Abb. 44</b>	CCCP führt zu einer nahezu vollständigen Inhibition der ACTH-stimulierten Cortisolsekretion von Rinder-NNRZ in Suspension über 120 Minuten hinweg <span style="float: right;"><b>99</b></span>
<b>Abb. 45</b>	CSA (100nM) hemmt die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion von Rinder-NNRZ in Suspension über 120 Minuten hinweg nur geringgradig <span style="float: right;"><b>99</b></span>



	Seite
<b>Abb. 46</b>	Antimycin A und Oligomycin hemmen die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion von Rinder-NNRZ in Kultur <b>101</b>
<b>Abb. 47</b>	Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) hemmt die ACTH-stimulierte Cortisolfreisetzung von bovinen NNRZ über 20 Stunden hinweg <b>101</b>
<b>Abb. 48a, b</b>	Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) (10µM) hemmt die ACTH (1µM)-stimulierte Cortisolbiosynthese sowohl bis 30 Minuten ( <b>Abb. 48a</b> ) als auch über 120 Minuten hinweg ( <b>Abb. 48b</b> ); Oligomycin hat keinen deutlich hemmenden Effekt <b>102</b>
<b>Abb. 49</b>	Intrazellulärer Cortisolgehalt kultivierter NNRZ des Rindes nach 24 stündiger Kultivierungszeit. Zugewetzt wurde: ACTH (1µM), Oligomycin (25,8µM), Antimycin (37,5µM) und CCCP (10µM) <b>104</b>
<b>Abb. 50</b>	Stimulation der Cortisolsekretion durch ACTH (1µM) und Angiotensin II (100nM) an kultivierten Rinder-NNRZ <b>106</b>
<b>Abb. 51</b>	Die Stimulation der Ouabainfreisetzung durch ACTH (1µM) und Angiotensin II (100nM) an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 72-stündigen Inkubationsphase <b>107</b>
<b>Abb. 52</b>	Die Stimulation der Cortisolbiosynthese durch ACTH (1µM) und Angiotensin II (100nM) in Rinder-NNRZ in Kultur nach 16-stündiger Aequilibrierungsphase und anschließender 72-stündiger Inkubationsphase <b>108</b>
<b>Abb. 53</b>	Die Stimulation der Ouabainbiosynthese durch ACTH (1µM) in Rinder-NNRZ in Kultur nach 16-stündiger Aequilibrierungsphase und anschließender 72-stündiger Inkubationsphase. Angiotensin II (100nM) hat keinen Effekt <b>109</b>
<b>Abb. 54</b>	Die Biosynthese von Cardenoliden in Pflanzen (Stuhlemmer und Kreis, 1996 [1], Lichtstein et al., 1998 [3], Gärtner et al., 1994 [9] und Perrin et al., 1997 [4]). <b>112</b>
<b>Abb. 55</b>	Die Biosynthese von Cortisol in NNRZ und die daran beteiligten P450-Enzyme <b>113</b>
<b>Abb. 56</b>	Pregnenolon (100µM) steigert die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase <b>114</b>
<b>Abb. 57</b>	Progesteron (100µM) steigert die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase <b>114</b>
<b>Abb. 58</b>	Phenylephrin hat keinen Effekt auf die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase <b>115</b>
<b>Abb. 59</b>	Phenylephrin hat keinen Effekt auf die ACTH-stimulierte Ouabainfreisetzung. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase <b>116</b>
<b>Abb. 60</b>	Pregnenolon (100µM) steigert die ACTH-stimulierte Ouabainfreisetzung. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase <b>117</b>
<b>Abb. 61</b>	Progesteron (100µM) steigert die ACTH-stimulierte Ouabainfreisetzung. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase <b>117</b>

	<b>Seite</b>
<b>Abb. 62</b> Pregnenolon stimuliert die Cortisolsekretion; ACTH wirkt ausschließlich in Abwesenheit von Pregnenolon stimulierend auf die Cortisolsekretion. Messung an Rinder-NNRZ nach 4-stündiger Inkubation mit Pregnenolon bzw. ACTH und vorheriger 16-stündiger Aequilibrierungsphase	<b>119</b>
<b>Abb. 63</b> Pregnenolon stimuliert die Ouabainfreisetzung; ACTH übt nur in Kombination mit Pregnenolon eine zusätzlich stimulierende Wirkung aus, hat aber in Abwesenheit von Pregnenolon keinen Effekt auf die Ouabainfreisetzung. Messung an Rinder-NNRZ nach 4-stündiger Inkubation mit Pregnenolon bzw. ACTH und vorheriger 16-stündiger Aequilibrierungsphase	<b>119</b>
<b>Abb. 64</b> Progesteron stimuliert die Cortisolsekretion; ACTH übt nur in Abwesenheit von Progesteron einen stimulierenden Effekt auf die Cortisolsekretion. Messung an Rinder-NNRZ nach 4-stündiger Inkubation mit Progesteron bzw. ACTH und vorheriger 16-stündiger Aequilibrierungsphase	<b>121</b>
<b>Abb. 65</b> Progesteron steigert die Ouabainfreisetzung; ACTH übt keinen stimulierenden Effekt auf die Cortisolsekretion aus. Messung an Rinder-NNRZ nach 4-stündiger Inkubation mit Progesteron bzw. ACTH und vorheriger 16-stündiger Aequilibrierungsphase	<b>122</b>
<b>Abb. 66</b> Intrazellulärer Cortisolgehalt am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und danach weiter anschließender 16-stündiger Inkubationsphase mit ACTH, Pregnenolon, Progesteron und Phenylephrin an Rinder-NNRZ in Kultur	<b>124</b>
<b>Abb. 67</b> Intrazellulärer Cortisolgehalt am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH, Pregnenolon und Progesteron an Rinder-NNRZ in Kultur	<b>125</b>
<b>Abb. 68</b> Intrazellulärer Ouabaingehalt am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH, Pregnenolon und Progesteron an Rinder-NNRZ in Kultur	<b>126</b>
<b>Abb. 69</b> Die hypothetische Biosynthese von Corticosteroiden und Aldosteron und die daran beteiligten P450-Enzyme	<b>128</b>
<b>Abb. 70</b> Metyrapon ist ein Hemmstoff der 11 $\beta$ -Hydroxylase	<b>129</b>
<b>Abb. 71a, b</b> <b>Abb. 71a:</b> Effekt von Metyrapon auf die Cortisolkonzentration im Zellüberstand <b>Abb. 71b:</b> und intrazellulär unter Zusatz von Corticosteron	<b>129</b>
<b>Abb. 72a, b</b> <b>Abb. 72a:</b> Effekt von Metyrapon auf die Cortisolkonzentration im Zellüberstand <b>Abb. 72b:</b> und intrazellulär unter Zusatz von Aldosteron	<b>130</b>
<b>Abb. 73a, b</b> <b>Abb. 73a:</b> Effekt von Metyrapon auf die Ouabainkonzentration im Zellüberstand <b>Abb. 73b:</b> und intrazellulär unter Zusatz von Corticosteron	<b>131</b>
<b>Abb. 74a, b</b> <b>Abb. 74a:</b> Effekt von Metyrapon auf die Ouabainkonzentration im Zellüberstand <b>Abb. 74b:</b> und intrazellulär unter Zusatz von Aldosteron	<b>132</b>

	<b>Seite</b>
<b>Abb 75a, b</b>	<b>133</b>
<b>Abb. 75a:</b> Effekt von Metyrapon auf die Cortisolkonzentration im Zellüberstand <b>Abb. 75b:</b> und intrazellulär unter Zusatz von Pregnenolon und Progesteron	
<b>Abb 76a, b</b>	<b>133</b>
<b>Abb. 76a:</b> Effekt von Metyrapon auf die Ouabainkonzentration im Zellüberstand <b>Abb. 76b:</b> und intrazellulär unter Zusatz von Pregnenolon und Progesteron	
<b>Abb. 77</b>	<b>134</b>
Mögliche Funktion von Digitoxigenin als Vorläufer des Ouabagenins und damit der Ouabain-Synthese.	
<b>Abb. 78</b>	<b>135</b>
Cortisolgehalt im Zellüberstand am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH und Ouabain bzw. ACTH und Digoxin an Rinder-NNRZ in Kultur	
<b>Abb. 79</b>	<b>136</b>
Intrazelluläre Cortisolkonzentration am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH und Ouabain in Rinder-NNRZ in Kultur	
<b>Abb. 80a, b</b>	<b>137</b>
Cortisolkonzentration im Zellüberstand am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH und Ouabain ( <b>Abb. 80a</b> ) bzw. ACTH und Digoxin ( <b>Abb. 80b</b> ) an Rinder-Nebennierenrindenzellen in Kultur	
<b>Abb. 81a, b</b>	<b>137</b>
Intrazellulärer Cortisolgehalt am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH und Ouabain ( <b>Abb. 81a</b> ) bzw. ACTH und Digoxin ( <b>Abb. 81b</b> ) in Rinder-Nebennierenrindenzellen in Kultur	
<b>Abb. 82a, b</b>	<b>139</b>
<b>Abb. 82a:</b> Cortisolkonzentration im Zellüberstand <b>Abb. 82b:</b> intrazellulär am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit Digitoxigenin bzw. Digitoxigenin und Metyrapon (100µM). Messung an Rinder-NNRZ in Kultur	

### **Diskussion**

<b>Abb. 83</b>	Möglicher Mechanismus der ACTH-Stimulierung der Ouabainsynthese durch ACTH analog der des Cortisols (Hypothese)	<b>147</b>
<b>Abb. 84</b>	Hypothese der Biosynthese der Cardenolide in Pflanzen nach Stuhlemmer und Kreis (1996) [1] sowie Lichtstein et al., 1998 [3] als Grundlage für eine Hypothese der Biosynthese von Cardenoliden <i>in-vitro</i> durch NNRZ des Rindes	<b>148</b>

# Tabellenverzeichnis

	<u>Literaturübersicht</u>	Seite
<b>Tab. 1</b>	Pflanzliche Herzglykoside mit ihren Glykosid- und Zuckeranteilen	<b>11</b>
<b>Tab. 2</b>	Die wichtigsten Herzglykoside und ihr Vorkommen in Pflanzen	<b>13</b>
<b>Tab. 3</b>	Taxonomische Einordnung der wichtigsten herzoglykosidhaltigen Pflanzen	<b>14</b>
<b>Tab. 4</b>	Amphibienarten, die Bufadienolide enthalten	<b>17</b>
<b>Tab. 5</b>	Die verschiedenen Herzglykoside besitzen die gleiche Grundstruktur (Abb. 7) und unterscheiden sich durch die Reste R1-R4. In der Tabelle nimmt die Polarität (und damit die Wasserlöslichkeit) der Herzglykoside von oben nach unten zu und die Lipidlöslichkeit in gleicher Richtung ab	<b>19</b>
<b>Tab. 6</b>	Herzglykoside beeinflussen die Zellen des Endokriniums	<b>29</b>
<b>Tab. 7</b>	Nachweise von Herzglykosiden in Säugetiergewebe	<b>32</b>
<b>Tab. 8</b>	Vergleich der Biosynthese von endogenem Ouabain und Aldosteron aus Pregnenolon (300ng/ml) und WIN 19578 (30µM), nach Hamlyn et al., 1998 [10]	<b>36</b>
	<u>Material &amp; Methoden</u>	
<b>Tab. 9</b>	Protokoll zur Beschichtung der Mikrotiterplatte am Vortag	<b>74</b>
<b>Tab. 10</b>	Arbeitsschritte zur Durchführung des ELISA-Verfahrens am Folgetag	<b>74</b>
<b>Tab. 11</b>	Pipettierschema der Mikrotiterplatte zur Analyse des Ouabaingehaltes in unbekannten Proben	<b>76</b>
<b>Tab. 12</b>	Ouabainkonzentrationen der Standardreihe gelöst in TBS-Puffer, nicht eluiert und einrotiert	<b>76</b>
<b>Tab. 13</b>	Pipettierschema zur Kontrolle der verwendeten Reinigungsmethode	<b>78</b>
	<u>Ergebnisse</u>	
<b>Tab. 14</b>	Wirkung von ACTH bzw. Angiotensin II auf die Cortisol-/Ouabainbiosynthese und –sekretion von NNRZ des Rindes als Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen	<b>110</b>
<b>Tab. 15a</b>	<b>Tab. 15a:</b> $V_{\max}$ - und $K_S$ -Wert-Bestimmung für die durch Pregnenolon und ACTH ausgelöste Freisetzung von Cortisol und Ouabain	<b>120</b>
<b>Tab. 15b</b>	<b>Tab. 15b:</b> $V_{\max}$ - und $K_S$ -Wert-Bestimmung für die durch Progesteron und ACTH ausgelöste Freisetzung von Cortisol und Ouabain	<b>123</b>

	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>Seite</b>
<b>Tab. 16</b>	Plasmakonzentrationen von Hormonen der Nebenniere im Blut des Menschen [10]	<b>146</b>



# 1. Einleitung

Herzglykosidhaltige Pflanzen werden seit mehr als drei Jahrtausenden zur Behandlung der Herzwassersucht (engl. „dropsy“) erfolgreich eingesetzt [11]. Vor rund 60 Jahren wurde erstmals vermutet, dass Herzglykosid-(Digitalis-)-ähnliche Substanzen auch im Organismus von Mensch und Tier vorhanden sind [12].

Vor kurzem wurde das wasserlösliche „Ouabain“, ein afrikanisches Pfeilgift, als Steroidhormon aus der Nebenniere isoliert [13]. Es beeinflusst den Natriumstoffwechsel und zirkuliert bei 50% der Patienten mit essentieller Hypertonie in erhöhten Konzentrationen im Blut [14]. Ein besseres Verständnis der Biosynthese und der Regulation dieses neuartigen Hormons eröffnet vermutlich neue Wege zum Verständnis der Ursachen und der Therapie der essentiellen Hypertonie und der damit vergesellschafteten Herzinsuffizienz.

In Deutschland sterben jährlich mit 33% der Todesfälle mehr Menschen an Störungen des Herzkreislaufsystems als an Krebserkrankungen, die „nur“ 25% der Todesursachen stellen. Ein Großteil der Kreislauferkrankungen ist die Folge einer essentiellen Hypertonie. Unter „essentieller Hypertonie“ versteht man eine Erkrankung, die alle bisher bekannten Ursachen des Bluthochdrucks ausschließt. Die essentielle Hypertonie stellt mit ca. 80% aller Hypertonien den Hauptanteil aller Bluthochdruckerkrankungen.

Es gibt eine große Anzahl endogener Substanzen, die den Blutdruck akut ansteigen lassen (Katecholamine, Endotheline, Angiotensine). Diese spielen aber bei der sich langsam entwickelnden essentiellen Hypertonie keine entscheidende Rolle. Vermutlich kommt die essentielle Hypertonie durch ein Zusammenwirken verschiedener Faktoren zustande. Einer dieser Faktoren ist das oftmals als „endogenes Digitalis“ bezeichnete Ouabain.

50% der Caucasier, die an Bluthochdruck leiden, haben erhöhte Plasma-Ouabain-Spiegel [14]. Auch Patienten mit primärem Aldosteronismus oder einem Nebennierenrindentumor haben erhöhte Plasma-Ouabain-Konzentrationen. Nach operativer Entfernung des Tumors bzw. Adrenalectomie kommt es zu einer Absenkung des Plasma-Ouabains und gleichermaßen zu einer Normalisierung des Blutdrucks [15]. Die Tatsache, dass die höchsten Ouabaingehalte in der Nebennierenrinde gefunden wurden und dass das von der Nebenniere abfließende Blut höhere Konzentrationen an Digitalis-ähnlichen Faktoren besitzt als das arteriell zuströmende, ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Nebennierenrinde der Hauptsyntheseort für zirkulierendes Ouabain ist. Das im Blutplasma zirkulierende Ouabain stammt vermutlich nicht aus der Nahrung, denn es wird nur maximal 3-5% des oral zugeführten Ouabains aus dem Darm resorbiert [16].

Ein besseres Verständnis der Biosynthese des Ouabains, seiner hormonellen Kontrolle und seiner Wirkungsweise bei physiologischen (nicht-toxischen) Konzentrationen ist erforderlich, um zu verstehen, wie dieses Steroid den Blutdruck dauerhaft erhöht und damit Herzinsuffizienz induziert. Daraus sollten sich bessere Möglichkeiten nicht nur für die Diagnostik und Bekämpfung der essentiellen Hypertonie, sondern auch für die Therapie der Herzinsuffizienz ableiten lassen.

Die Erforschung der Herkunft und Bedeutung des Ouabains trägt daher wesentlich zum Verständnis der essentiellen Hypertonie bei.

### 1.1 Zielsetzung

Da klare Aussagen zum Biosyntheseweg und zur Regulation der Ouabainfreisetzung am lebenden Tier schwierig zu erarbeiten sind, haben sich die nachfolgenden Studien auf *in-vitro*-Untersuchungen an Nebennierenzellen konzentriert. Es musste zunächst untersucht werden, ob primäre Zellen aus der Nebennierenrinde oder aus dem Nebennierenmark, oder ob Nebennieren-Zelllinien für solche Studien geeignet sind. Da das Hormon Cortisol in weit größeren Mengen von Nebennieren gebildet wird als das Ouabain, wurde zur Überprüfung der Lebens- und Synthese-Fähigkeit der untersuchten Zellen jeweils auch die Cortisolfreisetzung vergleichend gemessen.

Im Einzelnen habe ich folgende Fragen untersucht:

1. Wird Ouabain von isolierten Nebennierenrinden- bzw. Nebennierenmarkzellen des Rindes bei der von uns verwendeten Methodik synthetisiert und freigesetzt? Kann anstelle von primären Nebennierenrindenzellen des Rindes die Ouabain-Synthese an einer Nebennieren-Zelllinie untersucht werden?
2. Ist die Freisetzung des Cortisols energieabhängig und lassen sich so Rückschlüsse auf die Biosynthese und die beteiligten Transportsysteme ziehen?
3. Über welche steroidal Vorstufen erfolgt die Biosynthese von Ouabain in der Nebenniere? Kann der aus Pflanzen bekannte Syntheseweg der Herzglykoside auf Nebennierenrindenzellen des Säugers übertragen werden?
4. Steuern die Hormone, welche die Cortisolsynthese und –freisetzung aktivieren, gleichzeitig auch die Ouabainbiosynthese und –freisetzung, und beeinflussen Herzglykoside die Sekretion von Cortisol aus Nebennierenrindenzellen des Rindes?



## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Herzglykoside**

#### **2.1.1. Geschichte der Herzglykoside in Pflanzen und Säugetieren**

Herzglykoside enthaltende Pflanzen werden seit mindestens dreitausend Jahren als Arzneimittel gegen eine Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt. Der Papyrus Eber bezeugt, dass bereits unter der Herrschaft der Pharaonen in Ägypten im Jahr 1600 v.Chr. die diuretische Wirkung der Meerzwiebel (*scilla maritima*) bekannt war [16]. Das in ihm vorhandene Herzglykosid Scillarenin wurde von Hippocrates 400 v.Chr. als Meerzwiebelextrakt, vermischt mit Honig und Wein, eingesetzt, um verstärkten Harnfluss (Diurese) zu erzeugen. Salben mit Extrakten von digitalishaltigen Pflanzen wurden zur Therapie von Kopfschmerzen und Spasmen [17] benutzt [16, 18]. Welsh gibt in seinem pharmazeutischen Buch „Meddygon myddmia“ dem Fingerhut (*Digitalis*) den Namen „foxes glova“ (Fuchshandschuh), was den Ursprung der englischen Bezeichnung der Pflanze als „Foxglove“ erklärt. Es ist der Verdienst des englischen Arztes William Withering, die damals empirische Anwendung der Extrakte des Fingerhutes auf spezielle Indikationen festgelegt zu haben. In seiner 1785 erschienenen Monographie „An account of the foxglove, and some of its medical uses: With practical remarks on dropsy, and other diseases“ zeigt er nicht nur, dass das Indikationsgebiet der Wirkstoffe der *Digitalis*-Pflanzen die als “dropsy” bezeichnete “Herzwassersucht” ist, die heute als Herzinsuffizienz bezeichnet wird [11]. Er gibt darüber hinaus genaue Dosierungsanleitungen an. Da Herzglykoside in Pflanzen in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen, wurde in der Folge versucht, über die Isolierung der Reinsubstanzen und das Studium der therapeutischen Anwendung die geringe therapeutische Breite der Herzglykoside besser zu beherrschen.

In Straßburg gewann 1875 der deutsche Pharmakologe Oswald Schmiedeberg das „Digitoxin“ in reiner Form aus herzglykosidhaltigen Blättern. Arnaud kristallisierte 1888 aus Rinde und Wurzel des afrikanischen Ouabaio-Baumes (*Acocanthera ouabaio*) ein wasserlösliches Herzglykosid, das er Ouabain nannte. In Deutschland wurde die gleiche Substanz Strophanthin genannt. Arnaud benutzte in seinen Studien die Information, dass Eingeborene in Kamerun ein Pfeilgift aus dieser Pflanze herstellten, das als Herzgift wirkt. Als Quelle für

dieses Gift können auch andere Pflanzen dienen, wie *Strophanthus*-Arten (*Strophanthus hispidus*, *gratus*, *kombe*, *emini* und *sarmentosus*) oder auch *Acocanthera*-Arten [19].

Jacobs und Biegelow klärten 1932 die Struktur des Ouabains auf. Im gleichen Zeitraum wurden die chemischen Strukturen weiterer Herzglykoside beschrieben. Insbesondere die Arbeitsgruppe um den Baseler Chemiker Reichstein entdeckte dabei, dass in dem chinesischen Herzmittel Chan'Su -einem Extrakt der Krötenhaut- Herzglykoside mit einem 6-gliedrigen, ungesättigten Lacton-Ring enthalten sind. Diese Bufadienolide kommen als Proscillaridin A zu einem geringeren Anteil auch in der Meerzwiebel vor (*Scilla maritima*). Kröten können cardiotone Steroide (Bufadienolide) aus Cholesterol selbst synthetisieren [20]. Die Idee, dass es ein endogenes „Digitalis“ geben könne, wurde gelegentlich um 1880 geäußert [21]. Die Vorstellung ergab sich aus der die Zeitgenossen verblüffenden diuretischen und die Herzkraft steigernden Wirkung, von der man nicht wusste, wie sie zustande kam. 1953 hat der damals für seine Arbeiten zur Muskelfunktion sehr geachtete Biochemiker Szent-Györgyi erneut postuliert, dass es ein endogenes Digitalis gebe [12]. Dieses Postulat wurde im gleichen Jahr niedergeschrieben, in dem der Schweizer Veterinär-Pharmakologe Hans-Jörg Schatzmann in Bern publizierte, dass die Herzglykoside spezifische Hemmstoffe der Natriumpumpe der Plasmamembran sind [22].

Diese Beobachtung war sehr wesentlich, um die in den Plasmamembranen von Krebs-Nerven vorhandene  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  als Natriumpumpe zu identifizieren [18]. Als dann in den 60-iger Jahren der Natrium-Calcium-Austauscher nicht nur in Nervenzellen, sondern auch in Herzmuskelzellen von Säugetieren nachgewiesen wurde, kam es zu der in allen Pharmakologie-Büchern dargestellten Annahme, dass die Hemmung der Natriumpumpe durch therapeutische Konzentrationen von Herzglykosiden zu einem intrazellulären Anstieg des  $\text{Na}^+$  führe, was sekundär über einen Efflux des Natriums über den Natrium-Calcium-Austauscher in den extrazellulären Raum einen Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$  im intrazellulären Kompartiment auslöst. Diese Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration müsste dann den positiv inotropen Effekt (Kontraktilitätssteigerung) der Herzmuskulatur auslösen.

Bei weitgehender Akzeptanz dieser Hypothese als Lehrmeinung zur Wirkungsweise von Herzglykosiden wurde weiterhin vor allem in klinischen Labors nach der Existenz eines endogenen Digitalis geforscht. Man nahm zunächst an, dass die diuretische Wirkung der Herzglykoside mit der Existenz eines natriuretischen Faktors gleichzusetzen sei. Die Existenz eines derartigen Faktors ließ sich in Parabiose-Versuchen an Hochdruck-Ratten nachweisen [23]. Hamlyn et al. verfolgten die Idee, dass dieser den Bluthochdruck erzeugende natriuretische Faktor eventuell ein Hemmstoff der Natriumpumpe sein könne. Sie publizierten

1982 in der Zeitschrift „Nature“, dass im menschlichen Blut die Konzentration eines Hemmstoffes der Natriumpumpe mit dem arteriellen Blutdruck ansteigt [24]. Diese Beobachtung eröffnete einen Wettlauf um die Isolierung dieses endogenen „Digitalis“ und um seine chemische Charakterisierung. Auf dem Weg zu diesem Ziel wurden Faktoren mit einer Hemmwirkung auf die Natriumpumpe in fast allen Geweben nachgewiesen. Es wurde dabei deutlich, dass es leicht möglich war, endogene Hemmstoffe der Natriumpumpe zu isolieren, wenn ihre Hemmwirkung nicht an ganzen Zellen, sondern an gereinigter  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  getestet wurde. Als Messparameter benutzte man hierbei die Hemmung der ATPase-Reaktion. Zu solchen Substanzen gehörten Lipide und die Ascorbinsäure. Offensichtlich binden diese in der Nähe der ATP-Bindungsstelle und hemmen so indirekt die Natriumpumpe. Erst als man dazu überging, über die Hemmung der  $\text{Rb}^+$ -Aufnahme in ganzen Zellen den Ionenflux an der Natriumpumpe direkt zu messen, gelang es „endogenes Digitalis“ sicher nachzuweisen. Ouabain oder ein Isomer des Ouabains konnte 1991 aus dem Blutplasma des Menschen isoliert werden [25]. 7 Jahre später konnten Schneider et al. in Giessen [13] und Kawamura et al in Boston [26] und New York durch die Strukturanalyse zeigen, dass aus Nebennieren und dem Hypothalamus von Rindern das auch in Pflanzen vorkommende Ouabain isoliert werden kann [26]. Inzwischen wurde auch gezeigt, dass Phäochromocytomzellen (PC12-Zelllinie der Ratte) Ouabain synthetisieren können. Neben Ouabain konnten jedoch noch weitere endogene Herzglykoside aus biologischen Flüssigkeiten und Geweben isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Es handelt sich dabei um Digoxin, Marinobufagenin und 19-Norbufalin. Die jüngsten Untersuchungen zur biologischen Funktion dieser endogenen herzaktiven Steroide lassen vermuten, dass sie unterschiedliche, z.T. aber überlappende Funktionen haben [27].

Während Ouabain vorwiegend eine den Blutdruck steigernde Wirkung insbesondere in Stress-Situationen hat, scheint Digoxin dieser Wirkung entgegen zu arbeiten. Mehrwöchentliche Gaben von Ouabain im nanomolaren Konzentrationsbereich, bei dem keine Hemmung der Natriumpumpe gefunden wird, erzeugen bei Ratten Bluthochdruck [28]. Gleiche Konzentrationen von Digoxin, zusätzlich appliziert, wirken diesem Effekt entgegen. Marinobufagenin, das bei Herzinfarkt in erhöhten Konzentrationen mit dem Urin ausgeschieden wird, scheint eine natriuretische Wirkung zu haben [29]. Daneben gibt es Hinweise auf weitere, endogene herzaktive Steroide. Die Funktion des 19-Norbufalin scheint mit der Katarakt-Bildung der Linse verknüpft zu sein [30-32].

Die Entdeckung speziell des endogenen Ouabains in Säugetieren mit seinen hypertensinogenen Eigenschaften warf eine Reihe neuer Fragen auf: Woher stammt das endogene

Ouabain in Säugetieren? Unterscheidet es sich von dem pflanzlichen Ouabain? Wird es über die Nahrung aufgenommen? Wird es endogen synthetisiert? Wo könnte sich der Syntheseort befinden? Worin bestehen die physiologischen Funktionen des Ouabains? Welche pathophysiologischen Wirkungen sind denkbar und sogar nachweisbar? Welche Einflussfaktoren auf die eventuelle Biosynthese und Freisetzung des endogenen Ouabains gibt es?

Von diesen Fragen konnten bisher nur Teilaspekte beantwortet werden:

Bei der Suche nach einem endogenen Natriumpumpeninhibitor isolierten Schneider et al., 1988 [13] aus Rindernebnieren eine mit Fraktion B bezeichnete Substanz, die mit Ouabain identisch war: „Hence, natrium pump inhibitor B from bovine adrenals is the cardenolide ouabain.“. Durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektrometrie [13, 26] und LC-ESI-MS-Massenspektrometrie [33] konnte gezeigt werden, dass das endogene Ouabain mit dem aus Pflanzen stammenden Ouabain identisch ist.

Die Nebenniere, vor allem der Bereich der Rinde, wurde als das zentrale Organ für die Ouabainspeicherung beschrieben. Diese Schlussfolgerung ergab sich aus folgenden Ergebnissen: Es wurde festgestellt, dass die Ouabainkonzentration in der Nebenniere von Ratten 500 mal höher ist als die Plasma-Ouabainkonzentration [25]. Adrenalektomie, nicht aber die Entfernung des Nebennierenmarks, führte bei Ratten innerhalb von wenigen Tagen dazu, dass der Plasma-Ouabain-Spiegel um 50% abfiel [34]. Bei primärem Aldosteronismus waren die Plasma-Ouabainspiegel durchschnittlich um das 8-fache erhöht [35]. Dass die Nebennierenrinde nicht nur Speicherort, sondern auch Syntheseort für Ouabain ist, ist wahrscheinlich, weil enterales Ouabain nur zu 3-5% aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert wird [16]. Dennoch findet in geringem Umfang eine Aufnahme von oral und parenteral verabreichtem Ouabain in die Nebenniere statt, was sehr plastisch durch Fütterungsversuche mit radioaktiv-markiertem Ouabain an Ratten gezeigt werden konnte [36]. Diese Möglichkeit einer zellulären Aufnahme von Ouabain wurde vor allem an isolierten Rattenhepatozyten nachgewiesen [37-41].

Über lange Zeit hinweg glaubten einige Wissenschaftler jedoch nicht, dass die zelluläre Aufnahme von pflanzlichem Ouabain lediglich eine untergeordnete Rolle spielt [42]. Entgegen den Ergebnissen wurden auch zeitweise kritische Stimmen laut, die die Existenz von endogenen Herzglykosiden und die Bedeutung der Nebenniere in Zweifel zogen [43-48]. Weitere Untersuchungen, welche die Fragen nach der Biosynthese und Freisetzung von Ouabain beantworten sollten, wurden vor allem als Gewebekultur-Experimente an bovinen Nebennierenrindenzellen *in-vitro* durchgeführt. An ihnen konnte die *de novo* Biosynthese von

Ouabain und Dihydro-Ouabain gezeigt werden [46, 49-51]. Boulanger wies eine Ouabainsekretion aus der Nebenniere in das Blut von Hunden nach [52].

Eingehendere Forschungen an den verschiedenen Zell-Zonen der Nebennierenrinde des Rindes ergaben, dass die Zona glomerulosa (von größerer Bedeutung gemäß Laredo et al., 1995 [53]) und die Zona fasciculata zur Sekretion von Ouabain fähig sind. Sie wird durch ACTH und Angiotensin II stimuliert [50, 53]. Es ist bisher jedoch unklar, wie Ouabain in Säugerzellen biosynthetisiert und freigesetzt wird.

Im Jahre 1996 wurden dann auch andere Herzglykoside aus menschlichen Geweben isoliert und strukturell mit bereits bekannten Glykosiden verglichen: Von Hilton wurde in der menschlichen Plazenta ein Bufadienolid ( $3\beta$ -14 $\alpha$ ,20-21-Bufadienolid) gefunden, das ebenfalls die Natriumpumpe hemmt [54].

Proscillaridin A -immunoreaktives Material wurde im Plasma entdeckt [55] und Qazzaz et al. gelang der Nachweis von Digoxin-immunoreaktivem Material (DLIF-Genin: Qazzaz et al., 1996a [56] und Dihydro-DLIF: Qazzaz et al., 1996b [57]).

Goto stellte Ouabain-ähnliche Substanzen in menschlichem Urin fest (ODC-1), die Ouabain von seinem Rezeptor verdrängen, aber auch Digoxin-ähnliche (ODC-2) [58]. Der von Schneider im Plasma detektierte Natriumpumpeninhibitor „A“ wies immunoreaktiv eine große Ähnlichkeit mit Proscillaridin A auf [13, 59].

Hinsichtlich der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung, der Biosynthese und der Freisetzung sowie der jeweiligen Regulationsmechanismen auf dem recht jungen Gebiet der endogenen Herzglykoside, speziell des Ouabains, herrscht noch große Unklarheit.

## 2.1.2. Herzglykoside in Pflanzen

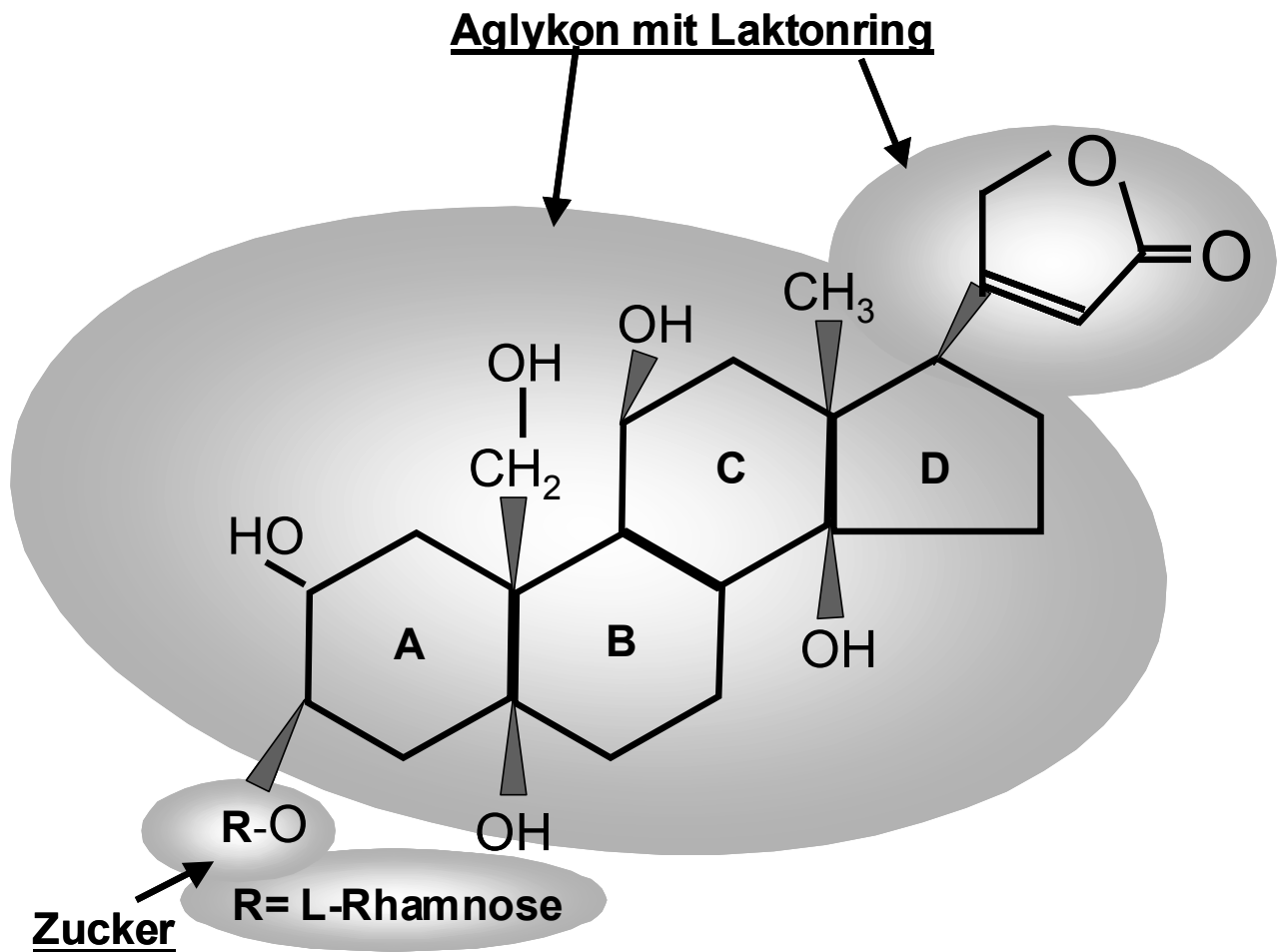
### 2.1.2.1. Chemie der Herzglykoside

Wie bereits der Name „Herzglykoside“ sagt, besteht diese Gruppe der Pflanzeninhaltsstoffe strukturell aus einem Glykosid des Grundgerüsts Cyclopentanoperhydrophenanthren [43, 60, 61]. Jedes Glykosid enthält grundsätzlich zwei Anteile, ein Aglykon (Genin) und einen oder mehrere Zucker (Abb. 1). Der Zuckeranteil wird über eine 3 $\beta$ -Hydroxygruppe an das C<sub>3</sub>-Atom des Aglykons gebunden.

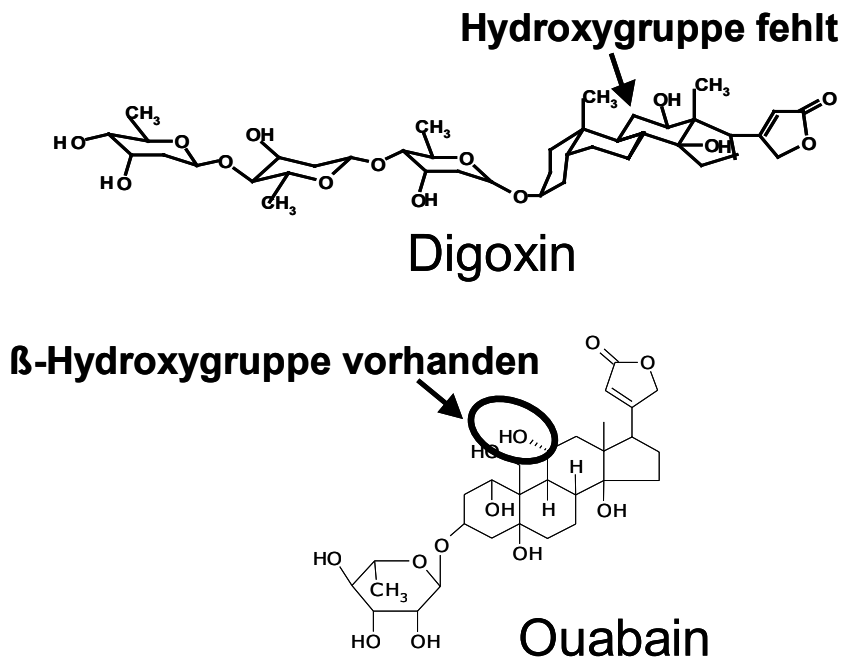
Das Steranskelett des Aglykons enthält die Ringe A, B, C und D. Auch Gallensäuren und Steroidhormone weisen dieses Steroidgrundgerüst auf. Die sterische Verknüpfung der vier Ringe ist für die Zuordnung zu einer der 3 Substanzgruppen entscheidend: Bei Herzglykosiden sind die Ringe A/B und C/D jeweils cis verknüpft und B/C trans [1, 4, 43]. Gallensäuren unterscheiden sich davon: Bei ihnen sind die A/B-Ringe cis und C/D-Ringe trans verknüpft. Bei Steroidhormonen findet sich generell nur eine trans-Verknüpfung bei A/B- und C/D-Ringen [4, 60]. Die A/B- und C/D-cis-Verknüpfungen sowie der ungesättigte Lactonring am D-Ring sind für die Erkennung der Herzglykoside durch die Natriumpumpe von großer Bedeutung [62].

Der Zuckeranteil an der C<sub>3</sub>-OH-Gruppe des A-Rings erhöht durch seine vielen OH-Gruppen die Wasserlöslichkeit des Herzglykosids. Er beeinflusst damit gemeinsam mit dem Steroid-Anteil die pharmakokinetischen Eigenschaften des Herzglykosids, wie die Resorption, die Plasma-Eiweißbindung, die Verteilung im Organismus, die spätere Metabolisierung und schließlich die Elimination.

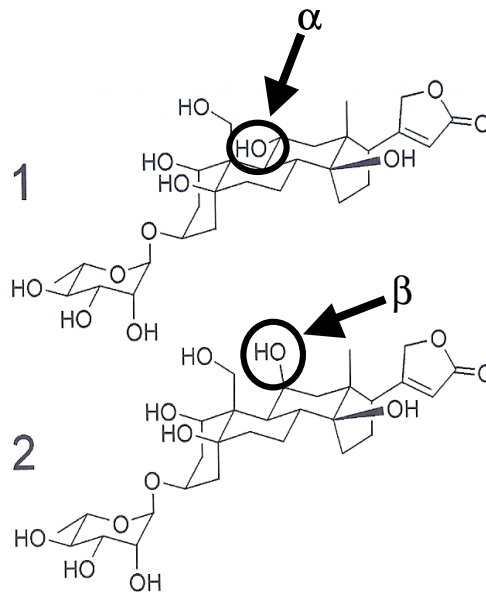
Manche Herzglykoside besitzen eine Hydroxygruppe am C<sub>11</sub>-Atom des Sterangerüsts (Abb. 2). Diese Hydroxygruppe im Ouabain gibt Anlass zur Uneinigkeit: Die Arbeitsgruppe um Hamlyn behauptet, dass es sich um eine  $\beta$ -Hydroxygruppe handelt, da sie axial zum Steroid angeordnet ist [63], Abb. 3. Damit ist das von ihm gefundene Ouabain-Isomer nicht identisch mit dem von Schneider et al. isolierten und durch <sup>1</sup>H-NMR in seiner Struktur identifizierten Ouabain, bei dem die 11-OH-Gruppe äquatorial am C-Ring absteht und damit eine 11- $\alpha$ -Hydroxylgruppe bildet (Abb. 3). Das von Schneider et al. gefundene Ouabain ist von pflanzlichem Ouabain damit nicht zu unterscheiden [13].



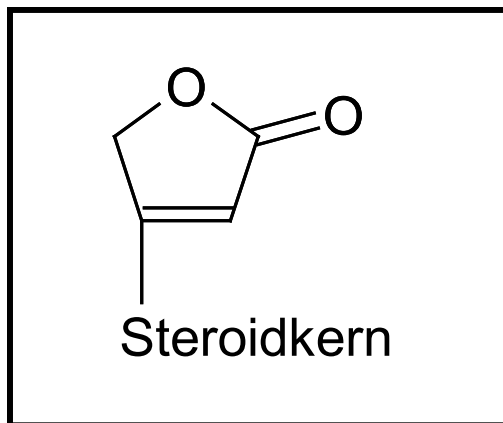
**Abb. 1: Strukturformel des Herzglykosids Ouabain (synonym g-Strophanthin), ein Cardenolid. Es besteht aus einem Aglykon und einem Zuckeranteil (Rhamnose).**



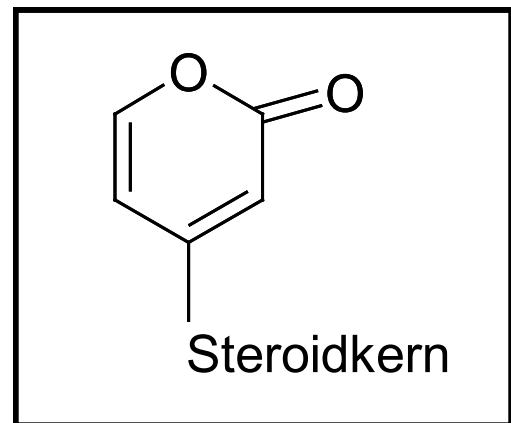
**Abb. 2: Vergleich der Strukturformeln der beiden Herzglykoside Ouabain und Digoxin. Digoxin besitzt im Gegensatz zu Ouabain keine 11-Hydroxygruppe in Position C<sub>11</sub>.**



**Abb. 3: Strukturisomere des Herzglykosids Ouabain: Struktur 1:** 11 $\alpha$ -Hydroxygruppe im pflanzlichen Ouabain und in Rinder-Nebennieren nach der  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse [13]. **Struktur 2:** 11 $\beta$ -Hydroxygruppe, angeblich im Ouabain-Isomer der Säuger nachgewiesen [63].



**Abb. 4a: Laktonring der Cardenolide**



**Abb. 4b:  $\alpha$ -Pyron-Ring (Pentadienolid-Ring) der Bufadienolide**



**Tab. 1: Pflanzliche Herzglykoside mit ihren Genin- und Zuckeranteilen**

Pflanze	Glykosid des Herzglykosids	Genin	Zuckeranteil
Digitalis purpurea Blätter	Purpureaglykosid A	Digitoxigenin	3 Moleküle $\beta$ -D-Digitoxose 1 Molekül Glucose
Digitalis lanata Blätter	Lanatosid C	Digoxigenin	3 Moleküle $\beta$ -D-Digitoxose 1 Molekül Glucose
Urginea maritima Zwiebel	Glucoscillaren A	Proscillaridin A	1 Molekül L-Rhamnose
Strophanthus kombè Samen	k-Strophanthosid	k- Strophanthidin	1 Molekül Cymarose 2 Moleküle D-Glucose
Strophanthus gratus Samen	g-Strophanthin (Ouabain)	Ouabagenin	1 Molekül L-Rhamnose

Der Zuckeranteil des Ouabains ist eine  $\alpha$ -L-Rhamnose [62]. Bei anderen Herzglykosiden treten aus der Gruppe der Monosaccharide zumeist 2-Desoxyhexosen wie  $\beta$ -D-Fucose, D-Xylose und Cymarose auf (Tab. 1).

Als 6-Desoxyhexosen kommen die D-Glucose und die L-Rhamnose vor, sowie als 2,6-Bis-desoxyhexose die  $\beta$ -D-Digitoxose (Tab. 1). Es können bis zu fünf Monosaccharidreste in einer Herzglykosid-Zuckerkette auftreten, wobei D-Glucose in der Oligosaccharidkette stets endständig angeordnet ist.

Der an C<sub>17</sub> im D-Ring in  $\beta$ -Stellung vorhandene ungesättigte Laktonring ist für die Hemmung der Natriumpumpe essentiell (Abb. 1, 4a, 4b). Er ist ebenfalls für die immunologische Erkennung des Ouabains durch den in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären Antikörper notwendig. Dihydro-Ouabain, das einen gesättigten Lactonring besitzt, wird mit deutlich geringerer Affinität gebunden. Es hemmt die Natriumpumpe erst bei weit höheren Konzentrationen [64]. Es werden fünfgliedrige und sechsgliedrige Formen des ungesättigten Laktonrings gefunden, die Herzglykoside in Cardenolide und Bufadienolide einteilen lässt (Abb. 4a, 4b) [65]. In Pflanzen kommt zumeist der ungesättigte, fünfgliedrige Lactonring vor (Abb. 4a) [62]; es handelt sich damit um Cardenolide. Substanzen mit sechs-gliedrigem

Lactonring werden aufgrund ihres Vorkommens in Kröten (*bufo bufo*) auch als Bufadienolide bezeichnet. Diese Herzglykoside kommen häufiger im tierischen Organismus vor.

### 2.1.2.2. Vorkommen in Pflanzen

Pflanzen enthalten meist (Abb. 5a,b) nicht ein einzelnes Herzglykosid, sondern ein Gemisch verschiedener Glykoside; häufiger kommen Cardenolide und nur sehr selten Bufadienolide vor. Die Pflanzenfamilien, die Herzglykoside enthalten, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Sie gehören den Klassen Magnoliatae und Liliatae an [16, 62].



Abb. 5a



Abb. 5b

**Abb. 5a, b: a) Frühlingsadonisröschen, *Adonis vernalis*; b) Roter Fingerhut, *Digitalis purpurea***

Tabelle 3 gibt eine taxonomische Zuordnung dieser herzoglykosidhaltigen Pflanzen aus Tabelle 2 an. Bufadienolide, die nur mit wenigen Vertretern der Liliaceae und Ranunculaceae sehr selten vorkommen [2], stellen in Süd-Afrika und Australien aber ein großes Problem dar. Die dortigen Viehverluste (Rinder und Schafe) werden zu 33% durch Pflanzengifte, zu denen auch diese herzoglykosidhaltigen Pflanzen gehören, ausgelöst [62, 66, 67].

**Tab. 2: Die wichtigsten Herzglykoside und ihr Vorkommen in Pflanzen**

<b>Gruppe</b>	<b>Glykosid</b>	<b>Pflanzen-Beispiel</b>
<b>Digitaloid-Gruppe</b>	Lanatosid C (Digoxigenin-Glykoside)	Wolliger Fingerhut
	Purpureaglykosid A (Digitoxigenin-Glykoside)	Roter Ringerhut (Abb. 5b)
<b>Ouabain-Gruppe</b>	g-Strophanthin	Strophanthus gratus
<b>Strophanthidin-Gruppe</b>	k-Strophanthosid	Strophanthus kombè
	Convallatoxol	Maiglöckchen
	Adonitoxin	Frühlingsadonisröschen (Abb. 5a)
	Thevetin A	Gelber Oleander
<b>Scilla-Gruppe</b>	Scillaren A	Meerzwiebel
	Uzarin, Xysmalorin	Uzara
<b>Pregnan-Glykoside</b>	Condurangin	Kondorliane

**Tab. 3: Taxonomische Einordnung der wichtigsten herzoglykosidhaltigen Pflanzen. Außer der Familie der Liliaceae (Klasse Liliatae) gehören alle der Klasse der Magnoliatae an.**

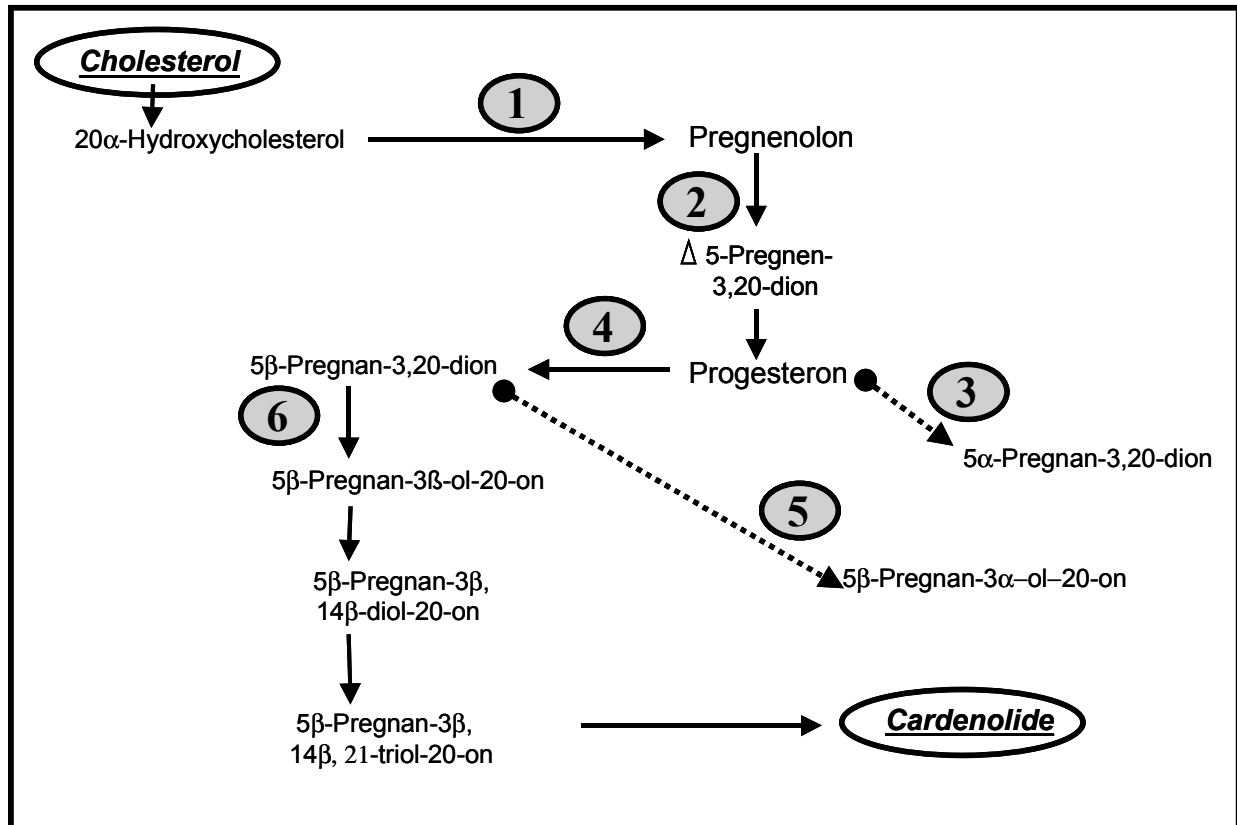
Familie	Art	Pflanzenbezeichnung
Scrophulariaceae Braunwurzengewächs	Digitalis purpurea Digitalis lanata	Roter Fingerhut (Abb. 5b) Wolliger Fingerhut
Apocynaceae Hundsgiftgewächs	Strophanthus gratus, komme auch Acokanthera schimperii, ouabaio	
	Thevetia peruviana	Gelber Oleander
Klasse: Liliatae Convallariaceae/Liliaceae Liliengewächs	Convallaria majalis	Maiglöckchen
Ranunculaceae Hahnenfussgewächs	Adonis vernalis	Frühlingsadonisröschen (Abb. 5a)
Hyacinthaceae Hyacinthengewächs	Urginea maritima	Meerzwiebel
Asclepiadaceae Schwalbenschwanzgewächs	Xysmalobium undulatum	Uzara
	Marsdenia condurango	Kondorliane

### 2.1.2.3. Biosynthese von Herzglykosiden in Pflanzen

Die an der Biosynthese der Cardenolide in Pflanzen beteiligten Enzyme sind bisher kaum bekannt. Nur fünf der beteiligten Enzyme konnten identifiziert werden (Abb. 6).

Aus dem Ausgangsprodukt Cholesterol wird mit Hilfe eines seitenkettenabspaltenden Enzyms, SCCE (side-chain-cleavage-enzyme), das bisher nicht genauer charakterisiert wurde, Pregnenolon (3 $\beta$ -Hydroxy-5-pregnen-20-on) gebildet [1]. Die Konfiguration seines Sterangerüsts ist A/B trans, B/C trans und C/D trans. Pregnenolon wird, katalysiert durch die

$\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta^5\Delta^4$ -Ketosteroid-Isomerase (3 $\beta$ -HSD), in Progesteron überführt. Die A/B trans-Konfiguration wird durch dieses Enzym in eine cis-Konfiguration umgewandelt. Die 3 $\beta$ -HSD und ihre Beteiligung an diesem enzymatischen Schritt wurde in pflanzlichen *Digitalis lanata* Zellen nachgewiesen.



**Abb. 6: Cardenolid-Biosynthese in *Digitalis lanata* Gewebe mit den bisher bekannten Enzymen (modifiziert nach Stuhlemmer und Kreis, 1996 und Schneider, 1985 [1, 2], Perrin et al., 1997 und Lichtstein et al., 1998, [3, 4]):** 1) SCC-Enzym (side-chain-cleavage-enzyme); 2)  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/ $\Delta^5\Delta^4$ -Ketosteroid-Isomerase (3 $\beta$ -HSD); 3) Progesteron-5 $\alpha$ -Reduktase; 4) Progesteron-5 $\beta$ -Reduktase; 5) 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-5 $\beta$ -Oxidoreduktase; 6) 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-5 $\beta$ -Oxidoreduktase

Aus Progesteron wird sodann über den Zwischenschritt des 5 $\beta$ -Pregnan-3 $\beta$ -ol-20-on schließlich 5 $\beta$ -Pregnan-3,20-dion produziert, was durch eine 5 $\beta$ -Reduktase vermittelt wird [1]. Diese 5 $\beta$ -Reduktase stellt das erste bekannte regulatorisch wirkende Enzym des Biosyntheseweges dar. Abgesehen von der in *Digitalis lanata* gefundenen 5 $\beta$ -Reduktase wurde außerdem aus den Mikrosomen von *Digitalis lanata* Zellen eine 5 $\alpha$ -Reduktase isoliert, die Progesteron zu 5 $\alpha$ -Pregnan-3,20-dion umwandelt. Da 5 $\alpha$ -Produkte allerdings keine Rolle bei der Cardenolid-Biosynthese spielen, ist davon auszugehen, dass die Progesteron-5 $\alpha$ -Reduktase zumindest für die Biosynthese pflanzlicher Cardenolide keine Bedeutung hat [68].

Das gleiche könnte auch für die 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-5 $\beta$ -Oxidoreduktase gelten, die in löslichen Teilen eines Proteinextraktes von *Digitalis lanata* gefunden wurde und 5 $\beta$ -Pregnan-3,20-dion zu 5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on transformiert. Auch dieses Enzym scheint an der Cardenolidbiosynthese nicht beteiligt zu sein, da 5 $\beta$ -Pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on kein Zwischenprodukt darstellt [69].

Die nächste Reaktion auf dem Weg zum Endprodukt ist die Konversion von 5 $\beta$ -Pregnan-3,20-dion zu 5 $\beta$ -Pregnan-3 $\beta$ -ol-20-on durch die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-5 $\beta$ -Oxidoreduktase, die aus *Digitalis purpurea* isoliert wurde [9]. Als letzter Umwandlungsschritt entsteht nach Hydroxylierung an Position C<sub>14</sub> das 5 $\beta$ -Pregnan-3 $\beta$ ,14 $\beta$ -diol-20-on mit cis-Konfiguration der C/D-Ringe. Die endgültige cis-trans-cis Konfiguration der Ringe A/B, B/C und C/D wurde damit erreicht.

Der Butenolidring bei den Bufadienoliden entsteht durch Kondensation der Pregnan-Seitenkette mit Malonyl-Coenzym A [2].

### 2.1.3. Herzglykoside in niederen Tierspezies

Herzglykoside haben in Amphibien folgende Funktionen:

- 1) Die Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes [65, 70].
- 2) Die Regulation der Natriumpumpe in der Amphibienhaut.
- 3) Die Abwehr von Fressfeinden durch toxische Wirkung der Herzglykoside [71]. Die Herzglykoside sind hierzu in der Amphibienhaut sehr hoch konzentriert.

Bei den in Kröten vorkommenden Herzglykosiden handelt es sich zumeist um Bufadienolide, die abgesehen von der Haut und der Hautoberfläche auch im Plasma und im Gehirn nachzuweisen sind. Hohe Plasmakonzentrationen an Bufadienoliden konkurrieren mit Ouabain um dessen Bindungsstelle an der Natriumpumpe. Über die Verbreitung der Bufadienolide bei Amphibien gibt Tabelle 4 Auskunft. Die aufgeführten Amphibien gehören der Ordnung der Froschlurche an.

**Tab. 4: Amphibienarten, die Bufadienolide enthalten**

Amphibienart	Literatur	
Bufo viridis	Lichtstein et al., 1991	[70]
Bufo marinus	Butler et al., 1996	[72]
Bufo arenum	Garraffo und Gros, 1986	[73]
Bufo bufo	Brubacher et al., 1999	[74]
Bufo paracnemis	Porto und Gros, 1971	[75]
Atelopus ignescens	Flier et al., 1980	[71]
Dendrophryniscus minutus		
Melanophryniscus moreirae		

*Colostethus inguinalis* und *Dendrobates auratus* sind Pfeilgiftfrösche, die wie auch *Phrynobatrachus natalensis* [71] als Vertreter der echten Frösche zu den Dendrobatidae zählen. Sie gehören zu den Amphibien, die in der Haut eine geringe Herzglykosid-Konzentration aufweisen und bei denen die Funktion der Herzglykoside in der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes über die Natriumpumpe besteht.

Lucibufagin ist ein Bufadienolid, das bei Insekten, z.B. bei Glühwürmchen, gefunden wurde, zu denen auch *Photinus pyralis*, *P. ignitus* und *P. marginellus* zählen [62]. Einzelne Insekten benutzen Cardenolide auch, um für Vögel ungenießbar zu werden, so z.B. der Monarchfalter. Er betreibt allerdings keine endogene Synthese, sondern nimmt während des Larvenstadiums pflanzliches Herzglykosid-Material auf [76, 77].

*Rhabdophis tigrinus* ist eine Schlangenart in Japan und Südafrika. Sie hat im Nacken bufadienolidhaltige Drüsen, die der Abwehr von Gegnern dienen [78].

Die Tatsache, dass immunreaktives Ouabain sogar in Fischen vorkommt, weist aber darauf hin, dass Ouabain den Wasser- und Salzhaushalt reguliert. Tilapia (*Oreochromis mossambicus*), zu den Buntbarschen gehörend, weist eine Plasmakonzentration von 5-20 pg/ml an immunreaktivem Ouabain auf. Die Ouabain-Immunreaktivität wurde bei diesem Vertreter der Buntbarsche in allen Geweben detektiert, wobei im Kopf, in den Nieren und im Magen-Darm-Trakt die höchsten Konzentrationen gemessen wurden [79].

## **2.1.4. Herzglykoside in Säugetieren**

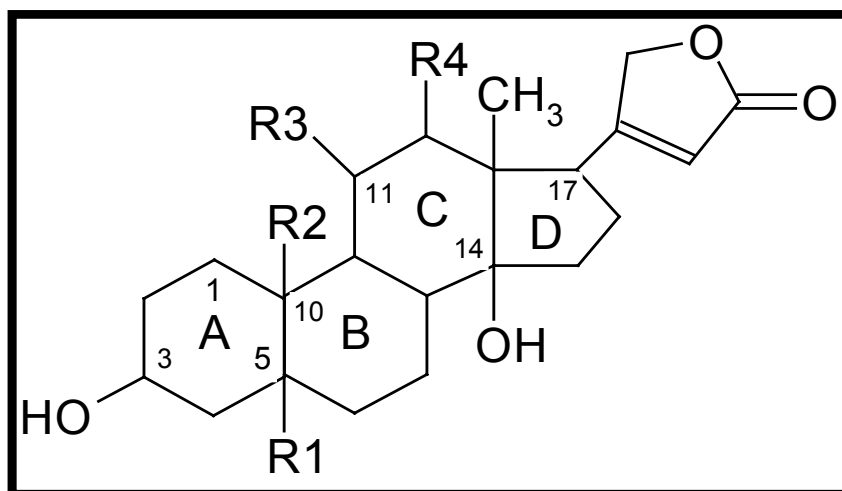
### **2.1.4.1. Pharmakokinetik der Herzglykoside**

Der Weg eines Pharmakons durch den Organismus wird durch seine Aufnahme, die Bindung im Blut an Plasmaproteine, die Verteilung auf verschiedene Gewebe, seine Verstoffwechselung und seine Ausscheidung bestimmt (Abb. 8). Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Lipophilie bzw. Polarität der Substanz. Sie bestimmt den Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten  $P_{O/W}$ . Polare Substituenten am Steroidkern sowie die alkoholischen OH-Gruppen des Zuckers steigern die Wasserlöslichkeit der Herzglykoside (Abb. 7).

Die Lipidlöslichkeit spielt für die Resorption der Herzglykoside durch die Darmwand eine entscheidende Rolle; ebenso auch für den Grad der Bindung an Plasmaproteine, die Leberpassage, und die Ausscheidung mit der Galle und über die Nieren. Strophanthine, und somit auch Ouabain (g-Strophanthin) sind zur oralen Herztherapie ungeeignet, da ihre hohe Wasserlöslichkeit (Tab. 5) bei oraler Aufnahme eine schlechte Resorbierbarkeit aus dem Darm bedingt und eine rasche Ausscheidung über die Nieren zur Folge hat.

Die aus oraler Verabreichung dem Organismus effektiv zur Verfügung stehende Ouabainmenge beträgt weniger als 10% [16], worin sich Ouabain von der enteralen Resorption von bis zu 100% des Digoxin deutlich unterscheidet. Ein Patient müsste daher bei einer Therapie seiner Herzinsuffizienz mit Ouabain äußerst große Mengen an Ouabain peroral zu sich nehmen, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen oder er müsste eine intravenöse Verabreichung erhalten. Da aber eine intravenöse Applikation aufgrund der geringen therapeutischen Breite der gesamten Substanzgruppe der Herzglykoside zu vielen Zwischenfällen führte, wird Ouabain medizinisch nicht mehr verwendet.





**Abb. 7: Grundstruktur herzwirksamer Glykoside (Cardenolide)**

**Tab. 5: Die verschiedenen Herzglykoside besitzen die gleiche Grundstruktur (Abb. 7) und unterscheiden sich durch die Reste R1-R4. In der Tabelle nimmt die Polarität (und damit die Wasserlöslichkeit) der Herzglykoside von oben nach unten zu und die Lipidlöslichkeit in gleicher Richtung ab**

	R1	R2	R3	R4
Digitoxin	H	CH <sub>3</sub>	H	H
Digoxin	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
k-Strophanthin	OH	CHO	H	H
g-Strophanthin	OH	CH <sub>2</sub> OH	OH	H
Ouabain				

Die Verstoffwechselung der Herzglykoside erfolgt auf unterschiedlichen Wegen (Abb. 8).

Die Metabolisierung der Herzglykoside in der Leber kann durch Konjugation mit Glucuronsäure, Sulfatierung, Abspaltung der Zuckerkomponente, weitere Hydroxylierung des Geninanteils, Epimerisierung an der C<sub>3</sub>-Position und durch bakterielle Hydrierung des Laktonringes im Kolon geschehen.

Das wasserlösliche Ouabain wird zu ca. 60% ohne Metabolisierung renal ausgeschieden (Abb. 8). Bei Ratten wurde eine hohe Ausscheidung über die Galle nachgewiesen [16].

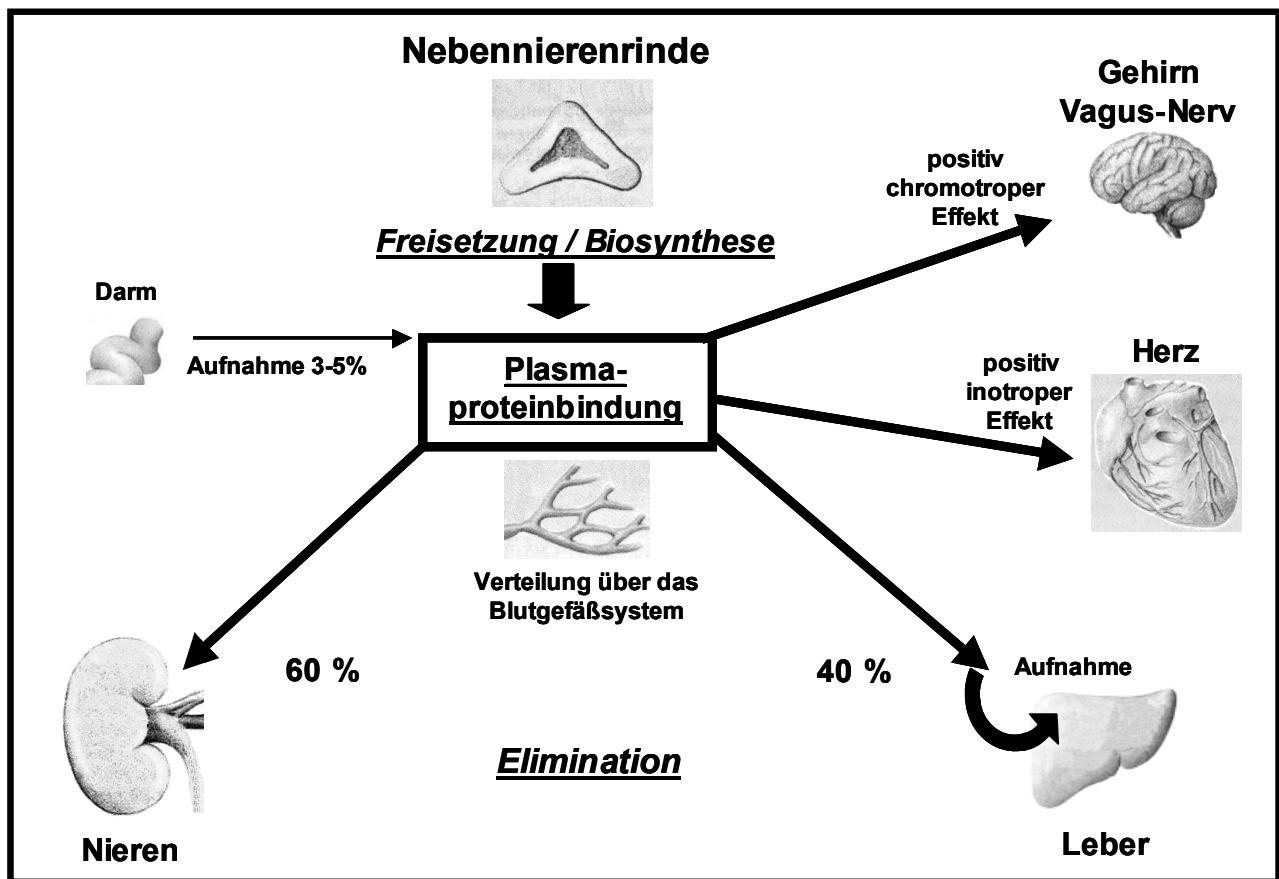


Abb. 8: Übersicht über die Pharmakokinetik des Ouabains im Säugetierorganismus

Herzglykoside mit hoher Lipidlöslichkeit werden über die Leber ausgeschieden: 25% des Digitoxins bleiben dem Organismus länger erhalten, da dieser Anteil jeweils durch den enterohepatischen Kreislauf der endgültigen Elimination entgeht. Die Relevanz der Lipidlöslichkeit wird anhand eines Dosisvergleiches deutlich:

Bei der therapeutischen Anwendung des Digoxins beträgt beim Menschen die Erhaltungsdosis 125-500 µg/Tag (orale Applikation), wohingegen die therapeutische Wirkung des stärker lipophilen Digitoxins (vgl. Abb. 7; Tab. 5) mit nur 0,7-2,8 µg/Tag (orale Applikation) aufrecht erhalten werden kann (Laborinformation des Jahres 2005 des Institutes für klinische Chemie der TU München).

### **2.1.4.2. Pharmakodynamik der Herzglykoside**

Allgemein induzieren Steroidhormone genomische sowie nicht genomische Effekte. Die genomischen Effekte bedingen eine Wechselwirkung mit einem spezifischen Rezeptor. Sie induzieren, vermittelt durch diesen Rezeptor, eine Signalkaskade, die entweder Effekte auf Proteine im Cytoplasma auslöst oder aber das Ablesen der genetischen Information der DNA im Zellkern beeinflusst. Die Beeinflussung dieser Signalwege verändert sowohl die physiologische Antwort der beteiligten Zellen als auch die des gesamten Organismus. Über welchen Rezeptor wirken Herzglykoside?

#### **2.1.4.2.1. Aufbau und Physiologie der Natriumpumpe**

Schatzmann beobachtete 1953, dass Ouabain die Ionengradienten von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  in Erythrozyten verändert [22]. Er interpretierte seine Befunde als eine Hemmwirkung der Herzglykoside auf die Natriumpumpe ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase). Dieses Membranprotein wurde 1956 von Skou isoliert und als Rezeptor der Herzglykoside bestätigt. Jens C. Skou erhielt dafür 1997 den Nobelpreis.

Die Natriumpumpe hält das lebensnotwendige Konzentrationsgefälle der Kationen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  über die Plasmamembran aufrecht. Sie schafft dadurch die Voraussetzung für die Energetisierung  $\text{Na}^+$ -abhängiger Transportprozesse in resorbierenden Epithelien (Darmmucosa, Niere) und für die elektrische Erregbarkeit aller Zellen, insbesondere aber der Nervenzellen. Die Natriumpumpe stellt nach deren Erregung (Depolarisierung) das Ruhepotential wieder her. Das gilt auch für Neuronen [80], für Skelettmuskelzellen [81] und für Herzmuskelzellen [82]. Der elektrochemische Gradient für das Ruhepotential über die Zellmembran entsteht, weil die Natriumpumpe bei der Hydrolyse für 1 Mol ATP 3  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle hinaus und im Gegenzug 2  $\text{K}^+$ -Ionen in die Zelle hinein transportiert [65].

Die Natriumpumpe ist ein in der Plasmamembran lokalisiertes Enzym [83], das aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und eventuell einer  $\gamma$ -Untereinheit besteht [84-86]. Die  $\alpha$ -Untereinheit besitzt die katalytischen Eigenschaften das Energiesubstrat ATP zu spalten, die Kationen  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  in einem Antiport zu transportieren und Herzglykoside auf der Zellaußenseite zu erkennen. Die Herzglykoside binden zwischen der ersten und zweiten der insgesamt 10 transmembranären Domänen der  $\alpha$ -Untereinheit [85] an der Zellaußenseite der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [80, 84]. Das

zur Energieversorgung der Pumpe benötigte ATP wird auf der cytosolischen Seite gespalten [80].

Es gibt drei Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  [83, 87, 88], die eine unterschiedliche gewebe- [86] und speziesspezifische Affinität [83, 87, 89] zu Ouabain aufweisen [90]. Sie werden in der Form verschiedener Isoproteine exprimiert [83, 91, 92].

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit (mit höchster Substrataffinität zu Ouabain) kommt in allen Geweben vor [93]. Die  $\alpha_2$ -Untereinheit kommt im Gehirn, in adulten Myocardzellen, in Lipozyten und in der Muskulatur vor. Die  $\alpha_3$ -Untereinheit (mit geringster Affinität zu Ouabain) ist in fetalen Myocardzellen und in neuronalem Gewebe zu finden [86, 87, 93].

Die  $\beta$ -Untereinheit besteht aus nur einer transmembranären Domäne und ist ein glykosiliertes Protein [85]. Sie hat einerseits die Aufgabe während der Biosynthese der Natriumpumpe die  $\alpha$ -Untereinheit richtig zu falten. Andererseits ist sie für das „Trafficking“, also den intrazellulären Transport vom endoplasmatischen Reticulum in den Golgi-Apparat und von da in die basolaterale Plasmamembran einer Endothelzelle zuständig und somit essentiell [94].

Von der  $\beta$ -Untereinheit sind bisher zwei Isoformen,  $\beta_1$  und  $\beta_2$  bekannt. Die  $\beta_2$ -Untereinheit kommt nur im Gehirn vor [87], die  $\beta_1$ -Untereinheit ist jedoch weitreichend verteilt.

Die  $\gamma$ -Untereinheit ist ein nur aus 58 Aminosäuren bestehendes Lipoprotein [86], das ebenfalls gewebespezifisch exprimiert wird [95]. Beim Menschen ist die  $\gamma$ -Untereinheit in der Niere, im Pankreas und in der fetalen Leber zu finden. Die  $\gamma$ -Untereinheit bindet an den cytoplasmatischen Teil der  $\alpha$ -Untereinheit, was zu einer partiellen Hemmung der  $\text{Na}^+$ -Pumpenaktivität und einer Stabilisierung der  $\text{E}_2$ -Konformation (siehe unten) der Natriumpumpe führt [96]. Bei ATP-Mangel oder Anorexie, was in beiden Fällen einen Abfall des pH-Wertes erzeugt, wird die Bindung zwischen  $\gamma$ -Untereinheit und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erhöht. Dies zieht eine verstärkte Hemmung der Pumpenaktivität nach sich [96]. Die  $\gamma$ -Untereinheit senkt im Falle des pH-Abfalls die Pumpenaktivität, wird jedoch für den eigentlichen Pumpprozess nicht benötigt [96, 97].

Die Natriumpumpe kommt in zwei Enzym-Konformationen vor: Sie werden als  $\text{E}_1$ - und als  $\text{E}_2$ -Konformation bezeichnet. Die  $\text{E}_1$ -Konformation ist zum Cytoplasma hin offen und die stabilste Konformation des unphosphorylierten Enzyms. Die Natrium-Bindungsstellen haben in diesem Zustand eine hohe Affinität zu Natrium, die Kalium-Bindungsstellen jedoch eine geringe zu Kalium. Die Anwesenheit von ATP und Natrium ermöglicht die Phosphorylierung

an der ATP-Bindungsstelle. Nach der Phosphorylierung befindet sich die Natriumpumpe auf einem hohen Energieniveau und hat Natrium im transmembranären Proteinanteil eingeschlossen. Die Natriumpumpe geht nun in die  $E_2$ -Konformation über, wobei ihre Affinität für Natrium abnimmt und für Kalium ansteigt. Natrium wird daher in den extrazellulären Raum abgegeben und Kalium an seine Bindungsstelle im transmembranären Anteil der  $\alpha$ -Untereinheit eingeschlossen. Durch millimolare ATP-Konzentrationen wird eine Konformationsänderung erzwungen, die zu einer Abgabe des  $K^+$  ins Cytosol aus seiner „occludierten“ Form führt. Nach Abgabe auch des Kaliums kehrt die Natriumpumpe wieder in die  $E_1$ -Konformation zurück und bindet erneut Natrium.

Herzglykoside binden fest an die  $\alpha$ -Untereinheit der Natriumpumpe in der  $E_2$ -Konformation und blockieren damit die Hydrolyse von ATP und den  $Na^+/K^+$ -Antiport.

#### **2.1.4.2.2. Die Natriumpumpe als Rezeptor für Herzglykoside**

Wie kommt es durch Bindung der Herzglykoside an die Natriumpumpen von Kardiomyozyten zu der therapeutisch gewünschten Wirkung des positiv inotropen und des negativ chronotropen Effektes am insuffizienten Herz? Wie wird der langfristige hypertensinogene Effekt der Herzglykoside ausgelöst?

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit ist ubiquitär in der Plasmamembran der Kardiomyozyten verteilt. Die  $\alpha_2$ - und  $\alpha_3$ -Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit kommen nur an spezifischen Stellen vor. Die Isoenzymformen wurden in dem kleinen Bereich lokalisiert, in dem die Plasmamembran der Membran des sarcoplasmatischen Reticulums beinahe aufliegt. Dieser cytosolische Raum zwischen Plasmalemm und endoplasmatischem bzw. sarkoplasmatischem Reticulum wird PlasmERosom [98] oder auch „Signalosom“ [99] genannt. Die in diesem Bereich liegende Plasmamembran enthält ebenfalls den Natrium-Calcium-Austauscher. Die Hemmung der für Herzglykoside sensitiven  $\alpha_2$ - und  $\alpha_3$ -Untereinheiten führt in diesem Subplasmalemma-Raum des Plasmerosoms somit zu einer lokalen Erhöhung der Natriumkonzentration, was über den  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher zu einem Anstieg des  $Ca^{2+}$  und damit zu einer Öffnung von Store Operating Channels (SOC bzw. Calcium-Kanälen) führt. Der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Anstieg löst die Muskelkontraktion aus. Dieser Effekt führt auch zur schlagartigen Besserung der Symptome einer Herzinsuffizienz.

Lange Zeit glaubte man, dass nur der intrazelluläre Anstieg von Calcium für den positiv inotropen Effekt von Herzglykosiden verantwortlich sei. Nachdem man aber die ersten mit

einem Calciumanstieg verbundenen wachstumsregulierenden Effekte an den Myozyten festgestellt hatte, fiel auf, dass ein Calciumanstieg alleine nicht für die Blutdrucksteigerung und die veränderte Genexpression ausreichend sein kann. Es steht inzwischen sogar fest, dass die ersten Schritte der Signalkaskade nur durch die Wechselwirkung zwischen Ouabain und der Natriumpumpe angestoßen werden, also ohne eine Hemmung dieses Enzyms, und dass intrazelluläre Veränderungen der Ionenkonzentrationen wenig Einfluss ausüben [100, 101].

Hohe Dosen von Herzglykosiden lösen zwar eine Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  aus, aber schon niedrige therapeutische Konzentrationen an Ouabain führen bei Ratte und Mensch zu Bluthochdruck und verändertem Myozytenwachstum.

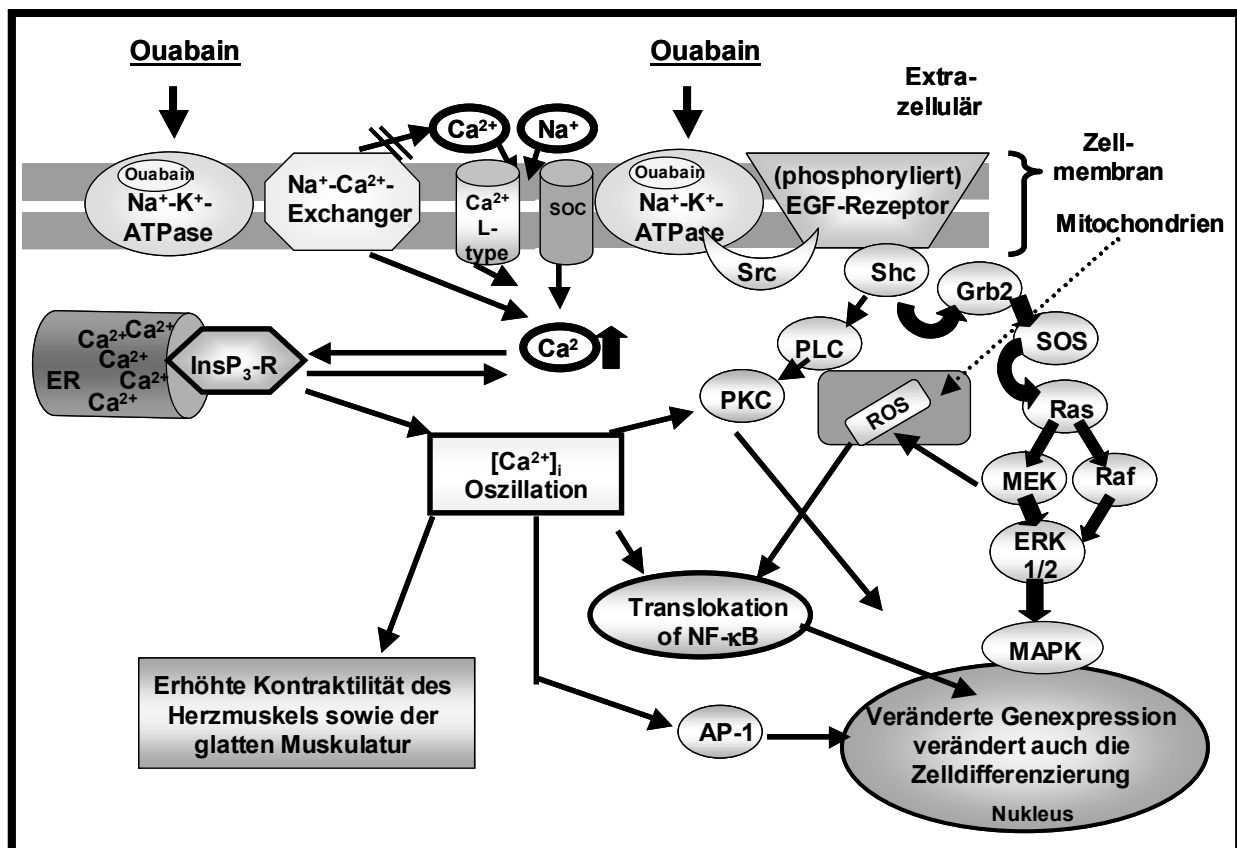
Die zelluläre Antwort lässt sich grundsätzlich in eine kurzfristige, die Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration (linker Bereich der Abb. 9) und in eine langfristige, die Beeinflussung der Genregulation über eine Signalkaskade mit der Beteiligung mitochondrial erzeugter ROS (=Reactive Oxygen Species) (rechter Bereich der Abb. 9) einteilen. Letztgenannte Erkenntnis wurde an kardialen Myozyten in Gewebekultur gewonnen, bei denen durch Ouabain-Anwendung im therapeutischen Bereich die Proteinbiosynthese der Myozyten und ihr Wachstum gesteigert wurde [5, 102].

Die Signalkaskade (der Abb. 9) beginnt damit, dass eine Tyrosin Proteinkinase (Src) entweder über einen Rezeptor vermittelt oder direkt über Ouabain aktiviert wird [100, 103]. Aktiviertes Src kommuniziert dann mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR= epidermal growth factor) und löst damit dessen Aktivierung aus. Aktivierter EGFR wiederum löst eine Bewegung von Shc (SH-2 domain-containing protein), Grb2, Sos und Ras zur Plasmamembran hin aus [100, 103] (graphische Darstellung und Erläuterung der Abkürzungen in Abb. 9). Ob Src dabei direkt oder indirekt mit der Natriumpumpe interagiert hat, ist noch unklar.

Aktiviertes Ras löst gleich zwei unterschiedliche weitere Kaskadefolgen aus: Zum einen wird die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien stimuliert, die zu einer Aktivierung des letztlich in den Zellkern eindringenden Translokationsfaktors NF- $\kappa$ B führen; andererseits wird eine Signalkaskade bestehend aus Ras/Raf/MEK/ERK1/2 aktiviert [7, 100, 102, 103].

Durch anschließende Aktivierung der MAPK wird die transkriptionale Genregulation im Zellkern ausgelöst, welche die Gene c-fos und c-jun (Transkriptionsfaktoren) z.B. aber auch wachstumsbezogene Faktoren, wie den Atrialen Natriuretischen Faktor,  $\alpha$ -Aktin und die  $\alpha_3$ -Untereinheit der Natriumpumpe stimulieren. Dies erklärt die Stimulation der Proteinbiosynthese mit daraus folgender Myozytenhypertrophie [102].

Über die vorgestellte Kaskade wird durch Shc außerdem die Phospholipase C (PLC) aktiviert, die die Stimulation zur Proteinkinase C (PKC) weiterleitet. Die PKC stellt nun einen wichtigen Vernetzungspunkt dar zwischen der intrazellulären Calciumerhöhung einerseits (Abb. 9) und der bereits vorgestellten Signalkaskade (Src/EGF Rezeptor-Komplex) andererseits [104], da sie Kontaktpunkt beider Signalwege ist. Aktiviert durch die PLC oder durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen führt sie über eine Aktivierung von Raf/MEK und ERK1/2 [104] und damit auch von MAPK, zu einer Veränderung der Genexpression.



**Abb. 9: Die Natriumpumpe als Signaltransducer und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Herzmuskelzelle und das Herz** (modifiziert nach Xie und Askari, 2002; Xie und Cai, 2003; Scheiner-Bobis und Schoner, 2001; [5, 7, 99]): EGF-R, Epithelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor; PKC, Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C; Grb2, Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindungsprotein; SOS, aktiviert Ras durch Austausch von GTP gegen GDP; Shc, Src, Homologe kollagenartige Proteine; MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen; MEK, MAPK-ERK-aktivierende Kinase; ROS, Reaktive Sauerstoffspezies; InsP<sub>3</sub>-R, Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor; SOC, „store-operated-channel“ spannungsabhängiger Calciumkanal; Ras, Protoonkogen P21 eine regulatorische GTPase; Raf, Ras-aktivierender Faktor.

Wie kommt es nun ohne Hemmung der Natriumpumpe durch Ouabain zu der intrazellulären Erhöhung der Calciumkonzentration als kurzfristige zelluläre Antwort auf die Ouabainwirkung (Abb. 9)?

Ein wesentlicher Bestandteil der früheren Lehrmeinung, nach der die intrazelluläre Calciumerhöhung allein verantwortlich für den positiv inotropen Effekt und die Zellhypertrophie ist, wurde durch die Entdeckung der Signalkaskade (Abb. 9) relativiert. Eine weitere Korrektur der bisherigen Lehrmeinung besteht darin, dass es sich bei der Calciumerhöhung nicht um eine absolute und permanente Konzentrationserhöhung handelt, sondern um Calcium-Oszillationen [7, 105] (Abb. 9).

Eine zentrale Rolle spielt bei diesen Oscillationen das Inositol 1,4,5-Triphosphat ( $\text{InsP}_3$ ), (Abb. 9). Es kann durch die PLC aus dem Membranlipid Phosphatidyl-Inositoltriphosphat freigesetzt werden. Gesichert ist, dass die Natriumpumpe durch eine direkte Wechselwirkung des  $\text{InsP}_3$ -Rezeptors mit dem terminalen Ende der  $\alpha$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [106] aktiviert wird. Diese Reaktion zwischen der Pumpe und dem  $\text{InsP}_3$ -Rezeptor löst die eigentlichen langsamen Calcium-Oszillationen aus, woran außerdem spannungsgesteuerte Calciumkanäle vom L-Typ und sogenannte SOC's (store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels) in der Plasmamembran beteiligt sind. Diese Calcium-Oszillationen führen (wie auch die Signalkaskade) zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern mit der daraus resultierenden Stimulation der Proteinbiosynthese. Dies induziert die Myozyten-Hypertrophie [105]. Auf direktem Weg kommt es durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zu der als positiv inotrop bezeichneten Steigerung der Kontraktilität des Herzmuskels, die durch schnelle Wechselwirkung mit den kontraktilen Proteinen der Herzmuskelzellen zustande kommt.

In arteriellen Endothelzellen wurde eine Stimulierung der Freisetzung des Peptidhormons Endothelin-1 (ET-1) durch Ouabain beobachtet. Endothelin-1 bewirkt eine Vasokonstriktion der Gefäße [107], wodurch Ouabain den Gefäßtonus erhöhen kann.

Ein Teil der bisherigen Theorie über die Wirkung der Herzglykoside ist die Annahme, dass die Hemmung der Natriumpumpe die Voraussetzung für die Effekte der positiven Inotropie und die Veränderung der Genexpression ist. Ein wichtiges Gegenargument dazu ist, dass bei Ouabain-Konzentrationen zwischen 1 und 10 nM keine Hemmung der Natriumpumpe ausgelöst wird, wohl aber die positive Inotropie und die Veränderung der Genexpression [107, 108]. Lediglich in kleinen Widerstandsgefäßen könnte Ouabain auch in nanomolaren Konzentrationen innerhalb von Plasmerosomen eine lokale Calciumerhöhung auslösen [98]. Solche lokalen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhungen innerhalb der Plasmerosomen können aber die



Freisetzung aus den intrazellulären Speichern über die SOC's und den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher unterstützen [109]. Dass Ouabain auch ohne eine intrazelluläre Calciumerhöhung wirken kann, beweisen aber die Aktivierung von ROS- und der MAPK [100].

Für die Auslösung der Signalkaskade spielen sehr wahrscheinlich Protein-Protein-Interaktionen zwischen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und den Nachbarproteinen eine wesentliche Rolle. Bei Stimulation und Proliferation der MAPK durch Ouabain oder Marinobufagenin, gemessen an humanen Endothelzellen der Nabelvenen oder an glatten Muskelzellen der Gefäße von Ratten, fehlte ebenfalls der korrelierende Effekt der Hemmung der Natriumpumpe [110-112]. Der Weg der Signalkaskade ist somit unabhängig von der Hemmung der Natriumpumpe.

Trotz aller dieser Befunde ist der Wirkungsmechanismus des Ouabains und anderer Herzglykoside noch nicht klar. Die Entdeckung, dass Ouabain an glatter Muskulatur Calciumströme induziert ohne dass die zytosolische Natriumkonzentration ansteigt [109], lässt die Frage offen, ob es noch andere zelluläre Wirkungsmechanismen der Herzglykoside gibt.

### **2.1.4.3. Physiologie und Pathophysiologie des Ouabains**

#### **Physiologische Funktionen von Ouabain an der Herzmuskulatur**

Die beiden Eigenschaften, hypertensinogen und gleichzeitig natriuretisch zu sein, waren die ursprünglichen Funktionen, die dem endogenen Digitalis zugeschrieben wurden [113-115].

Die Eigenschaft der Natriurese wurde über die Hemmung der renalen Natriumpumpen und die daraus resultierende Hemmung der renalen Natriumrückresorption erklärt [116, 117]. Ouabain könnte demzufolge dem Anstieg des Blutdrucks nach massiver Salzaufnahme entgegenwirken. Jedoch besitzt Ouabain in nanomolaren (und damit physiologischen) Konzentrationen keine natriuretischen Eigenschaften [118]. Ein entscheidendes Argument gegen die natriuretische Wirkung des Ouabains ist außerdem, dass die Plasma-Ouabain-Spiegel bei hypertensiven Patienten unter akutem und chronischem Salzverlust ansteigen [64]. Sollte Ouabain wirklich natriuretische Funktionen haben, dann müsste ein Ouabainanstieg demzufolge die Situation des Salzverlusts für den Organismus nur noch weiter verstärken.

Dennoch bestehen Korrelationen zwischen Ouabain und dem Salzhaushalt. Eine vermehrte renale Kaliumausscheidung führt zu einer Ouabainerhöhung im Plasma, wohingegen die

Kaliumkonzentration im Serum sowie die Natriumkonzentration im Serum und im Urin keinen Einfluss auf die Plasma-Ouabain-Konzentration haben [119].

Abgesehen von Kaliumverlusten verursachen auch intrazelluläre Natriumerhöhungen, chronisches Nierenversagen, Hyperaldosteronismus, chronische Herzinsuffizienz und Präeklampsie eine Erhöhung der Ouabainkonzentration [10, 17, 120]. Fische, die einem erhöhten Salzgehalt ihrer Umgebung ausgesetzt waren, zeigten einen Anstieg im Plasma, sowohl von Ouabain als auch von Cortisol, der mit einer Erhöhung der Plasmaosmolalität korrelierte [79].

Unter Kreislaufbelastung steigt bei Menschen (Versuche auf dem Ergometer), Hunden (Versuche auf dem Laufband) [121] und bei Ratten (Schwimm-Belastung) [122] die Plasma-Ouabain-Konzentration rasch an. Dieser Anstieg korreliert mit dem der Katecholamine (Adrenalin). Nach Beendigung der Kreislaufbelastung werden die Ruhewerte für Ouabain und Adrenalin nach ca. 10 bis 15 Minuten wieder eingestellt. Unter Vorbehandlung mit Benazepril oder Atenolol bleibt diese Erhöhung der Plasma-Ouabain-Konzentration aus. Durch Benazepril, einem Angiotensin-converting-enzyme-Inhibitor (ACE-Inhibitor), wird der Effekt von Angiotensin II über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor an den Nebennierenrindenzellen verhindert. Mit dem  $\beta$ 1-Blocker Atenolol wird die Katecholamin-bedingte Ouabainfreisetzung aus Nebennierenrindenzellen verhindert. Neben Angiotensin II spielt auch ACTH eine stimulierende Rolle für die Ouabainfreisetzung [123, 124].

Die Frage, wie die Ouabainfreisetzung mit dem Salz-Haushalt verknüpft ist, kann derzeit nicht klar beantwortet werden. Es ist jedoch unumstritten, dass Ouabain in der Regulation des arteriellen Blutdrucks eine wichtige Rolle spielt [119, 125-127].

Wenn Ouabain als Hormon auf andere Zellen wirken sollte, dann müsste es auch auf andere Zellen als die des Herz-Kreislauf-Systems wirken, denn die Natriumpumpe, die als Ouabain-Rezeptor anzusehen ist, findet sich in allen Zellen der Säuger. In der Tat sind einige Effekte des Ouabains auf Zellen des Endokriniums beschrieben worden (Tab. 6).

**Tab. 6: Herzglykoside beeinflussen die Zellen des Endokriniums.** Die angegebenen Effekte werden durch Dosierungen zwischen  $10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  M/L an Herzglykosiden ausgelöst

<b>Herzglykosid</b>	<b>Durch Herzglykoside beeinflusste Hormonsekretion</b>	<b>Literatur</b>	
Ouabain hemmt	Aldosteron-Sekretion	Szalay 1993; Dong et al., 2004	[128, 129]
Digoxin / Digitoxin hemmen	Progesteron-Freisetzung	Chen et al., 2001	[130]
Digoxin / Digitoxin hemmen	Corticosteron-Produktion	Wang et al., 2004; Szalay 1993	[128, 131]
Digitalis	Renin-Abfall	Schiebinger et al., 1989	[132]
Digitalis	Angiotensin-Abfall	Schiebinger et al., 1989	[132]
Ouabain stimuliert	Acetylcholin	Meyer und Cooper 1981	[133]

### **Pathophysiologische Funktionen von Ouabain an der Herzmuskulatur**

Ouabain löst, abgesehen von der blutdrucksteigernden und der kontraktilitätssteigernden Wirkung eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aus (Abb. 9) und führt dadurch zu einer Veränderung der Genexpression. Der langfristig pathophysiologische Effekt besteht darin, dass eine veränderte Genexpression von Proteinen der Zellproliferation zu einer Hypertrophie und sogar zu einer messbaren Verdickung der Herzmuskelwand führen kann: Die Langzeitapplikation von geringen (nanomolaren) Dosen an Ouabain löst daher bei Ratten Bluthochdruck aus [134-137].

50% der Caucasier, die an essentieller Hypertonie leiden, haben erhöhte Plasma-Ouabainspiegel, ein vermindertes Herzminutenvolumen und eine Vergrößerung der linken Herzwand [28]. Manunta konnte dabei sogar eine Korrelation zwischen der Plasma-Ouabain-Konzentration und dem Durchmesser der linken Herzwand, sowie dem Index des absoluten peripheren Widerstandes zeigen [125, 127]. Diese Wirkung des Ouabains kann durch gleichzeitige Verabreichung des Fab Fragmentes eines Anti-Digoxin Antikörpers (Digibind) verhindert werden, was vor einigen Jahren bereits am Menschen und an Ratten bewiesen wurde [138, 139]. Unter Ouabain-Einfluss löst die Signalkaskade über die Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren zunächst eine Umbildung des Herzens aus, die dann bei langfristigerer Einwirkung letztlich zum Finalstadium in Form des Herzversagens führen kann [140].

Die veränderte Zelldifferenzierung und die gesteigerte Zellproliferation unter Ouabain- bzw. Digoxineinfluss bedingen aber nicht nur die beschriebenen makroskopischen Veränderungen der Herzmuskulatur in Form der Zunahme der Herzwanddicke, sondern außerdem eine down-Regulation der  $\alpha_1$ -Isoform der Natriumpumpe im Myokard des linken Ventrikels [141]. Darüber hinaus wird die Sensibilität der Muskulatur gegenüber Ouabain erhöht, die für Marinobufagenin vermindert und es findet eine up-Regulation der  $\alpha_3$ -Isoform [140] statt.

### **Pharmakologische Hemmung des hypertensinogenen Ouabain-Effektes**

PST 2238 ist ein Digitoxigenin-Derivat und damit ein Strukturanalogon des Ouabains. Im Gegensatz zu Ouabain wirkt PST 2238 allerdings in mikromolaren Konzentrationen antihypertensiv [142, 143]. PST 2238 ist therapeutisch von großer Bedeutung, da es in Ratten mit genetisch-bedingter Hypertension den Blutdruck normalisiert und die erhöhte renale Natrium-Kalium-ATPase-Aktivität vermindert, nicht aber in normotensiven Ratten [144]. PST 2238 befindet sich daher gegenwärtig in Studien zum klinischen Einsatz und könnte eine Therapieform der essentiellen Hypertonie für den Menschen darstellen.

### **Physiologische Funktionen von Ouabain im Gehirn und am sympathischen Nervensystem**

Ouabain wurde im Hypothalamus [26], in der Hypophyse und auch in Markneuronen nachgewiesen [27]. Es zeigte sich an Ratten, dass eine Injektion von Ouabain in den 4. Hirnventrikel sowohl die Herzfrequenz als auch den Blutdruck und die sympathische Aktivität steigert. Der letztgenannte Effekt lässt sich durch parallele Verabreichung von Digibind (s.o.) verhindern. Über Benzamil-sensitive  $\text{Na}^+$ -Kanäle kommt es zu einem Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Konzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit [119, 145]. Im Gegensatz zur Plasmakonzentration hat  $\text{Na}^+$  in der Cerebrospinalflüssigkeit die Wirkung, die Ouabainfreisetzung zu erhöhen und damit die sympathische Aktivität und den Blutdruck steigernd zu beeinflussen [145]. Transgene Ratten mit Angiotensinogen-Mangel zeigen diese Effekte nur in verminderter Ausprägung [146]. Die Bedeutung des Angiotensinogen-Angiotensin-I-Angiotensin-II-Weges wird unterstützt durch die Entdeckung, dass in Ratten des Wildtyps eine Angiotensin Typ 1-Rezeptor Blockade die Steigerung der sympathischen Aktivität und des Blutdrucks hemmt [146]. Die Freisetzung des Angiotensin II hingegen wird

in Dahl S Ratten von massiver  $\text{Na}^+$ -Aufnahme nicht beeinflusst, wohl aber die Aktivität und Expression des Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE).

#### **2.1.4.4. Biosynthese der Herzglykoside im Säuger**

Nachdem nachgewiesen worden war, dass das im Säuger gefundene Ouabain nicht von pflanzlichem Ouabain zu unterscheiden ist [13], drängten sich zwei Fragen auf:

- 1) Wird Ouabain über pflanzliche Nahrung aufgenommen oder wird es tatsächlich endogen vom Säuger selbst synthetisiert?
- 2) Falls es im tierischen Organismus selbst synthetisiert wird, wo befindet sich dann dieser Syntheseort?

Um stichfeste Beweise für eine endogene Biosynthese des Ouabains zu erhalten, wurden menschliche Probanden für die Dauer von ca. einer Woche parenteral, und somit kontrolliert Herzglykosid-frei, ernährt. Ihr Plasma-Ouabain-Spiegel blieb jedoch unverändert [25]. Dies spricht für eine endogene Synthese. Das oral und parenteral aufgenommene Ouabain kann in den Nebennieren gespeichert werden, wie dies Fütterungsversuche an Ratten mit radioaktiv markiertem Ouabain zeigten [36]. Bei intestinaler Aufnahme gelangen insgesamt nur 3-5% der oral verabreichten Ouabain-Menge ins Blut [16], was eine endogene Biosynthese erforderlich macht.

Als Syntheseort kommen vor allem solche Gewebe in Frage, in denen bereits Herzglykoside nachgewiesen wurden (Tab. 7). Die Nebenniere wurde durch verschiedene Forschergruppen als das Hauptorgan für die Synthese und Speicherung von Ouabain identifiziert: Adrenalectomie führt zu einer Verminderung der Plasma-Ouabain-Spiegel [25, 147].

Die Hypothese, dass die Nebenniere ein Speicherorgan für Herzglykoside darstellt, wurde durch Versuche an Ratten belegt: Sie haben eine 500-fach höhere Gewebe-Konzentration an Digitalis-like-inhibiting factor, DLIF, als das Blutplasma [25, 148]. Diese endogenen Herzglykoside werden ins Blut abgegeben, was über die Messung arterio-venöser Differenzen des Ouabains gezeigt werden konnte [52, 148].

Die Beobachtung, dass Patienten mit Nebennierentumoren, die mit einem erhöhten Blutdruck einhergingen, nach Exzision des Tumors zu normalen Blutdruckwerten zurückkehrten [149, 150], bestätigte die Annahme der Nebenniere als Hauptsyntheseort. Nebennierenrinde und -mark wurden hinsichtlich ihrer Herzglykosidgehalte getrennt untersucht.

**Tab. 7: Nachweise von Herzglykosiden in Säugetiergewebe**

<b>Gewebe mit nachgewiesenen endogenen Herzglykosiden</b>	<b>Literaturquelle</b>	
Menschliches Plasma	Hamlyn et al., 1989 und 1991 Ludens et al., 1991	[25, 151, 152]
Nebenniere	Tamura et al., 1988 Doris und Stocco, 1989 Hamlyn et al., 1991 Ludens et al., 1992 Schoner et al., 1993 Qazzaz et al., 2000	[25, 34, 49, 65, 153, 154]
Leber	Hamlyn et al., 1991 Shaikh et al., 1991	[25, 148]
Niere	Hamlyn et al., 1991 Shaikh et al., 1991	[25, 148]
Hypothalamus	Hamlyn et al., 1991 Tymiak et al., 1993	[25, 155]
Hypophyse	Hamlyn et al., 1991 Ludens et al., 1992	[25, 34]

Dabei stellte man fest, dass die Nebennierenrinde deutlich höhere Konzentrationen hat als der Markbereich (bei Ratte und Rind handelte es sich bei diesem Unterschied um den Faktor 2 [34, 59, 148]). Unterstützend wurde gezeigt, dass die Adrenalektomie die Plasma-Ouabain-Spiegel innerhalb von sechs Tagen um ca. 50% senkt, wohingegen die Entfernung des Marks keine derartige Folge hat [34]. Abgesehen von der Nebenniere, könnten auch im Hypothalamus Herzglykoside biosynthetisiert werden [156]. Dies wurde 1989 vermutet; 1999

wurde das hier freigesetzte Herzglykosid als identisch mit Ouabain identifiziert, seitdem jedoch noch nicht weiter verfolgt [26].

Trotz dieser, eine endogene Ouabainbiosynthese in der Nebenniere, unterstützenden Befunde existieren Berichte, die diese Schlussfolgerung anzweifeln lassen: In seiner Studie mit humanen Probanden konnte Butt 1998 [47] keine Steigerung des Plasma-OLF-Gehaltes (OLF = Ouabain-like factor) nach Stimulation mit ACTH finden. Er schlussfolgert daher, dass die Nebenniere sehr wahrscheinlich nicht die Quelle für OLFs darstellt [47]. Wieso es zu diesen unterschiedlichen Befunden kommt, ist nicht klar. Es könnte sein, dass sich *in-vitro* Befunde nicht direkt auf die *in-vivo* Situation übertragen lassen. Daraus ergibt sich auch die Frage, inwieweit Ergebnisse von Primär-Zellkulturen mit denen von Zelllinien oder mit den Verhältnissen im Gesamtorganismus vergleichbar sind.

#### **2.1.4.4.1. Biosynthese der Herzglykoside in Nebennierenrindenzellen *in-vitro***

Nachdem die Nebennierenrindenzellen als ein Speicher- und Syntheseort für Ouabain identifiziert worden waren, wurden weitere Untersuchungen zur Frage der Biosynthese und der Stimulierung der Freisetzung des Herzglykosides an Zellkultursystemen fortgeführt. Ouabain bzw. OLF's (Ouabain-like-factors) wurden 1991 erstmals in Zellkulturüberständen nachgewiesen [25, 50, 53]. Die Beobachtung wurde genutzt, um weitergehendere Fragen zu klären: Welcher Metabolit ist eine Vorstufe der Herzglykosid-Biosynthese? Handelt es sich wirklich um eine Neusynthese? Welche Parallelen zum pflanzlichen Biosyntheseweg gibt es? Wie lässt sich die Biosynthese und die Aufnahme der Vorläufer-Metaboliten in die Nebennierenzellen stimulieren bzw. hemmen? Welche intrazellulären Signaltransduktionswege sind an einer Stimulation bzw. Hemmung beteiligt?

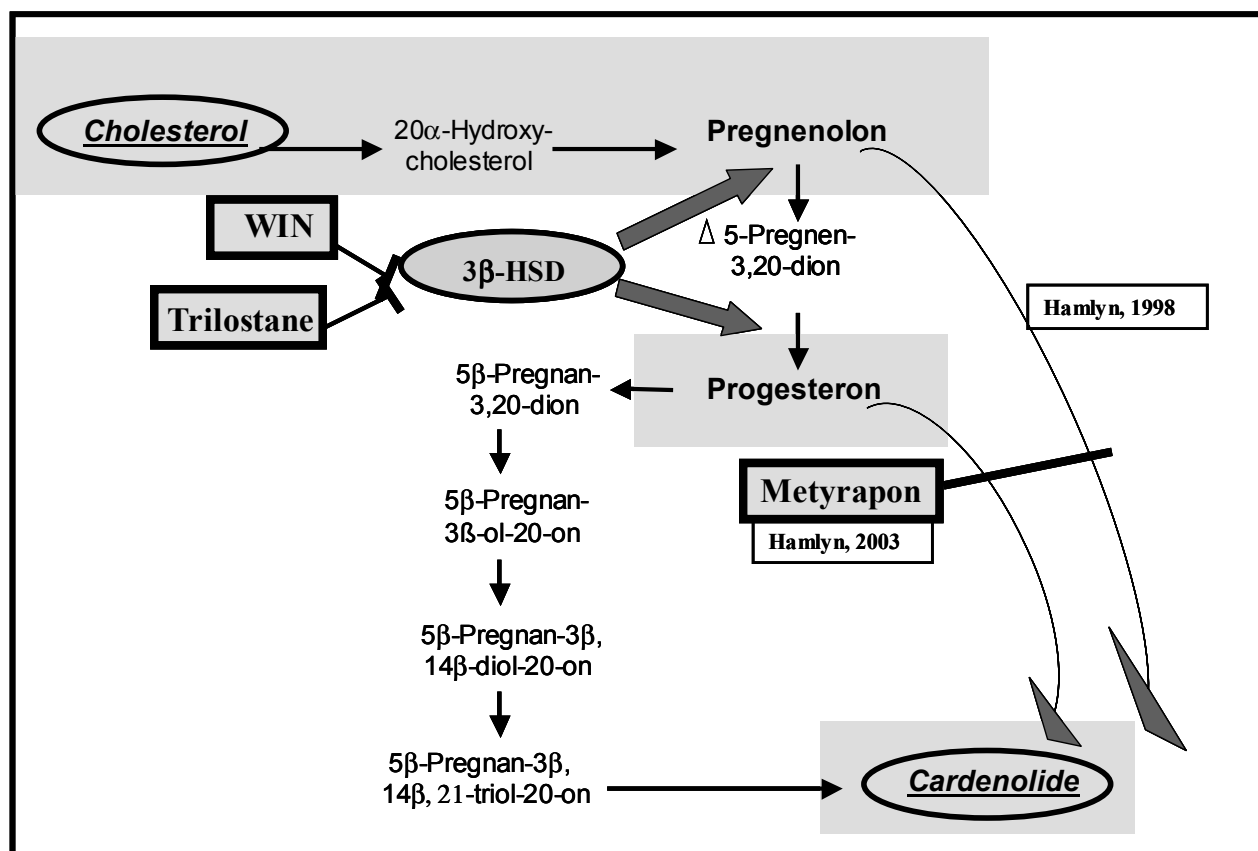
Schon 1957 hatte Siperstein eine Biosynthese von Herzglykosiden in Kröten nachgewiesen [157]. Dieser dem Zeitgeist widersprechende Befund wurde mit Skepsis aufgenommen: Die Biosynthese eines Moleküls mit mehreren strukturellen Besonderheiten (wie einem Laktonring, einer A/B cis-, B/C trans- und C/D cis-Konfiguration des Steran-Grundgerüsts und der Rhamnose an C3-Position) konnte angeblich nur in Pflanzenzellen vorkommen. Es war nie von einer tierischen Zelle berichtet worden, dass die Biosynthese hier möglich sei [61]. Gezweifelt wurde insbesondere deshalb, weil bei einem Start der Herzglykosid-

Biosynthese von Cholesterol aus (mit seiner Verknüpfung der Ringe als A/B trans-, B/C trans- und C/D trans-Struktur) wenigstens 2 Ringverknüpfungen aus der trans-Konfiguration in die cis-Konfiguration überführt werden müssen (A/B cis, C/D cis). Es wurde allgemein angenommen, dass nur Pflanzenzellen diese Umwandlung durchführen können [158]. Man konnte jedoch zeigen, dass radioaktiv markierte Rhamnose in Nebennierenrindenzellen aufgenommen wird und die Biosynthese des Ouabains steigert [4]. Rhamnose ist ein Zucker, der in Säugern auch an anderen Stellen vorkommt, wie z.B. in der Kaninchenhaut [159] und im Hypothalamus des Rindes [155]. Folglich muss eine Ouabainbiosynthese in Nebennierenrindenzellen erfolgen können. Dass Rinder-Nebennierenrindenzellen *in-vitro* bis zu 10-fach mehr an Ouabain freisetzen als ihr Zellgehalt ausmacht, lässt ebenfalls auf eine Biosynthese in diesen Zellen schließen [4, 46, 50]. Als eindeutigen Hinweis für eine Ouabain-Neusynthese wird jedoch die Stimulierung der Sekretion von endogenem Ouabain unter Angiotensin II angesehen bei gleichzeitig unverändertem, intrazellulärem Ouabaingehalt [50]. Eine vermehrte Ouabainfreisetzung ohne entsprechende Verminderung des intrazellulären Gehaltes kann nur durch eine Ouabain-Neusynthese in den Nebennierenrindenzellen erklärt werden. Qazzaz wies kürzlich erneut die de-novo Biosynthese von DLIFs nach [158, 160], sodass nunmehr der Frage nach den bei der Biosynthese endogener Herzglykoside beteiligten Enzymen und Intermediaten eine große Bedeutung zukommt.

Die im Folgenden aufgeführten Aspekte der Cardenolid-Biosynthese sind in Abb. 10 zusammengefasst. Ein sehr früher Schritt des Biosyntheseweges ist die Isoprenoid-Seitenkettenabspaltung des Cholesterols: Nur bei Verwendung von [1,2-<sup>3</sup>H]-25-hydroxycholesterol, nicht aber bei [26,27-<sup>3</sup>H]-25-hydroxycholesterol als Ausgangsmetabolit war Radioaktivität in Digitalis-ähnlichen Substanzen nachzuweisen. Gleiches galt auch für [7-<sup>3</sup>H]-pregnenolon [3]. 20- $\alpha$ -Hydroxycholesterol wird demnach als Ausgangssubstanz für die Biosynthese des Cardenolids Ouabain vermutet. Die Arbeitsgruppe um Doris fand allerdings im Gegensatz hierzu, dass eine Hemmung der Isoprenoid-Seitenkettenabspaltung und demzufolge eine Hemmung der Pregnenolon-Bildung die Ouabainbiosynthese der adrenalen Herzglykoside nicht beeinträchtigt [46, 154]. Beim Studium der Bufadienolid-Synthese in Kröten fand man, dass eine Erhaltung der intakten Isoprenoid-Seitenkette für die Biosynthese des Arenobufagenins essentiell ist [73]. Die Biosynthese der Cardenolide und der Bufadienolide geht somit unterschiedliche Synthese-Wege. Für die Biosynthese des Cardenolids Ouabain geht man des weiteren davon aus, dass Pregnenolon eine Vorstufe von Ouabain ist [4, 10, 33]. Es ist derzeit ungewiss, ob Progesteron tatsächlich auch als Vorläufer



dient. Bei der Synthese des Bufadienolids Marinobufagenin spielt hingegen Pregnenolon keine Rolle [161].



**Abb. 10: Biosynthese von Cardenoliden in Pflanzen nach Stuhlemmer und Kreis, 1996 sowie Schneider, 1985 [1, 2]. Grau unterlegt: Nachgewiesene Zwischenprodukte der Cardenolid-Biosynthese in Nebennierenrindenzellen des Rindes in-vitro.** WIN und Trilostane hemmen die 3β-HSD, die Pregnenolon zu Progesteron umsetzt. Metyrapon (2-methyl-1,2,-bis-(3-pyridyl)-1-propanon) hemmt die 11β-Hydroxylierung, die bei der Umsetzung von Pregnenolon bzw. Progesteron zu Ouabain nötig ist.

Es wird postuliert, dass Pregnenolon innerhalb des Biosyntheseweges der Cardenolide zu Progesteron umgesetzt wird [4]. Bei dieser Umsetzung besteht gegenwärtig ebenfalls noch Uneinigkeit: Pregnenolon wird durch die 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β-HSD) in Progesteron überführt (Abb. 10). Bei einer Hemmung der 3β-HSD durch Trilostane wird die Ouabainbiosynthese gehemmt [4]. Ein Gegenargument hierzu wurde von Hamlyn aufgestellt: Er findet bei einer Hemmung des Enzyms 3β-HSD einen Rückgang der Aldosteron-Synthese, jedoch eine Zunahme der Ouabain-Bildung [10]. Dies legt nahe, dass der Syntheseweg von

Cholesterol zu Pregnenolon führt und die Ouabainbiosynthese dann ohne Progesteron als Zwischenstufe fortgesetzt wird (Abb. 10).

Die sowohl von Pregnenolon als auch von Progesteron aus notwendige 11- $\beta$ -Hydroxylierung lässt sich durch Metyrapon (2-methyl-1,2,-bis-(3-pyridyl)-1-propanon) blockieren [63].

Innerhalb der Nebennierenrinde spielt die Zona glomerulosa für die Ouabainbiosynthese eine bedeutendere Rolle als die Zona fasciculata: Die Ouabaingehalte sind in der Zona glomerulosa boviner Nebennierenrindenzellen 5,7-fach höher als in der Zona fasciculata [53]. Auch die in 24 Stunden von Rinder-Nebennierenrindenzellen in den Zellüberstand sezernierte Ouabainmenge ist bei den Zellen der Zona glomerulosa um den Faktor 4,1 höher. Die Zona glomerulosa-Zellen lassen sich durch Angiotensin II und ACTH im Gegensatz zu den Zona fasciculata-Zellen stärker stimulieren [53]. Nach Perrin führt sowohl Pregnenolon als auch Progesteron zu einer Steigerung der Synthese Ouabain-ähnlicher Herzglykoside [4]. Hamlyn zeigte allerdings, dass die Verabreichung von Pregnenolon und WIN (ein Inhibitor der 3 $\beta$ -HSD) die Synthese des endogenen Ouabains enorm steigert und Progesteron demzufolge eine untergeordnete Rolle spielt [10, 63], (Tab. 8). Seinen Ergebnissen nach wird die Ouabainbiosynthese durch Metyrapon, einen Inhibitor der 11 $\beta$ -Hydroxylasen, gehemmt [10, 63].

Es besteht derzeit Uneinigkeit darüber, wie die Biosynthese von Cardenoliden ausgehend von Cholesterol abläuft. Es liegen widersprüchliche Resultate hinsichtlich der Funktion des Pregnenolons bzw. Progesterons als Intermediate vor. Daher wurde in unseren Versuchen die Biosynthese von Ouabain aus den postulierten Vorstufen Pregnenolon und Progesteron vergleichend nach Einwirkung von Syntheseinhibitoren untersucht (Kap. 7.8).

**Tab. 8: Vergleich der Biosynthese von endogenem Ouabain und Aldosteron aus Pregnenolon (300ng/ml) und WIN 19578 (30 $\mu$ M), nach Hamlyn et al., 1998 [10].**

	<u>Endogenes Ouabain</u> <u>[pmol/mg/2Std.]</u>	<u>Aldosteron</u> <u>[pmol/mg/2Std.]</u>
<b>Basal</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>
<b>+ Pregnenolon (300ng/ml)</b>	<b>1,1</b>	<b>2,1</b>
<b>+ WIN (30<math>\mu</math>M)</b>	<b>2,1</b>	<b>0,4</b>
<b>+ Pregnenolon (300ng/ml)</b>		

### 2.1.4.5. Stimulierung der Freisetzung von Herzglykosiden

Die Stimulierung der Freisetzung endogener Herzglykoside wurde hauptsächlich an isolierten Nebennierenrindenzellen von Rindern in Kultur untersucht. Für ACTH und Angiotensin II wurde bereits frühzeitig eine die Sekretion stimulierende Funktion postuliert [47, 50, 53, 162]. Ebenfalls als stimulierend erwiesen sich  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptoragonisten wie Phenylephrin [163].

Der ACTH-Einfluss ließ sich bisher nur *in-vitro* sicher zeigen. In *in-vivo* sind die Resultate einer ACTH-Stimulierung der Ouabainsekretion bzw. -biosynthese widersprüchlich. Während eine intramuskuläre Injektion von ACTH bei Ratten die Synthese von endogenem Digitalis stimulierte [162], ließ sich dies bei Mensch und Hund nicht bestätigen [47].

Die Signalkaskade der ACTH-Stimulation der Ouabainsekretion soll nach Shah über eine Erhöhung der c-GMP-Spiegel erfolgen [164].

Angiotensin II bindet bei Rinder-Nebennierenrindenzellen an den Angiotensin Typ 2 Rezeptor ( $AT_2$ ). Der  $AT_2$ -Rezeptor-Agonist CGP42112 stimuliert die Ouabainfreisetzung während der spezifische  $AT_2$ -Rezeptor-Antagonist PD123319 den Effekt des CGP 42112 und des Angiotensin II bei gleichzeitiger Applikation [165] blockiert. DUP 753 (ein  $AT_1$ -Rezeptor-Antagonist) mit Angiotensin II in Kombination verabreicht, beeinträchtigt den AII-Effekt nicht.

Einen Beweis für eine c-GMP-vermittelte Signalkaskade des Angiotensin II erbrachte der Einsatz eines membranpermeierenden Analogons (8-bromo c-GMP). Dieses stimulierte die basale Ouabainsekretion. Eine Ko-Inkubation von 8-bromo c-GMP und Angiotensin II führte zu keinem additiv stimulierenden Effekt. Bei einer Blockade des  $AT_2$ -Rezeptors nach Angiotensin II Applikation trat jedoch eine Hemmung der Ouabainsekretion auf [164]. Die intrazelluläre Signalkaskade des Angiotensin II verläuft nach Aktivierung des  $AT_2$ -Rezeptors über eine Aktivierung der Phospholipase C [166]. Das Enzym führt zur Freisetzung von Inositol-3-Phosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG), welches dann die Proteinkinase C aktiviert. Über die Proteinkinase C wird die Sekretion zwar von endogenem Digitalis nur minimal stimuliert, die Aldosteronsynthese jedoch in deutlichem Maße [164].

Dass auch das sympathische Nervensystem an der Regulation der Ouabainfreisetzung beteiligt ist, zeigten Versuche mit einer humanen Nebennierenrinden-Zelllinie (CRL7050 Zellen) und primären Rinder-Nebennierenrindenzellen in Kultur nach Phenylephrin-Verabreichung (ein  $\alpha_1$ -adrenerger Rezeptor-Agonist). Der stimulierende Effekt auf die

Sekretion ließ sich mit Doxazosin, einem  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptor-Antagonisten, blockieren [163].

An Ratten stellte man darüber hinaus fest, dass auch Hypoxie die Freisetzung von endogenem Digitalis aus dem Mittelhirn (Hypothalamus) und aus den Nebennieren fördert [167]. Die Hypoxie wird über Sauerstoffrezeptoren im Gehirn wahrgenommen [167, 168].

Ein weiterer Stimulus ist die Volumenexpansion des Blutes. Über einen solchen Effekt wurde von Gruber bei Hunden berichtet [169]. In Ratten löste die Volumenexpansion eine Erhöhung von cardiotonen Steroiden aus. Dies wurde von Boulanger jedoch widerlegt [52]. Fedorova allerdings fand unter diesen Bedingungen vor allem Marinobufagenin-ähnliche Substanzen (Bufadienolide) und weniger Ouabain-ähnliche Substanzen (Cardenolide) [29]. Hypovolämie und salz-induzierte Hypervolämie beeinflussten bei Hunden lediglich die Cortisol- und Aldosteronkonzentrationen, nicht aber die Sekretion der Ouabain-ähnlichen Faktoren [52, 120]. Gottlieb vermutet dennoch, dass der Plasma-Ouabain-Spiegel die Volumenhomöostase beeinflusst [120].

Bei Salz-sensitiven Dahl-Ratten, die längere Zeit mit salzhaltiger Diät gefüttert worden waren, stieg der Gehalt an Ouabain-ähnlichen Substanzen im Gehirn an, was mit einer Stimulation des sympathischen Nervensystems und einer Erhöhung des Blutdrucks einherging [170]. Die intracerebroventrikuläre Injektion von Fab-Fragmenten, die Ouabain binden konnten, blockierte diese Effekte [170-172]. Beim Menschen konnten die Ouabainwerte durch Erhöhung des Natrium-Spiegels im Blut ebenfalls gesteigert werden [149]. Nach vollständigem Salzverzicht stieg der Plasma-Spiegel Ouabain-ähnlicher Substanzen bei hypertensiven Patienten parallel zur Plasma-Renin-Konzentration an [118].

Auch die intraventrikuläre Injektion einer natriumreichen Lösung an anästhesierten Hunden führte zu einer Sekretionssteigerung eines die Natriumpumpen inhibierenden Faktors [173]. Eine intracerebroventrikuläre Infusion von Angiotensin II steigerte bei Hunden und Ratten die Plasmakonzentration von Natriumpumpeninhibitoren. Dieser Anstieg wurde durch Saralasin, einem Angiotensin-II-Inhibitor, gehemmt [174].

An Zellkultursystemen boviner Nebennierenrindenzellen kann die Ouabainsekretion mit steigendem Volumen des Kulturmediums erhöht werden: Pro Zeiteinheit wird in 10 ml Kulturmedium mehr Ouabain hinein sezerniert als in 3 ml [50]. Außerdem scheint ein negativer Rückkopplungsmechanismus zu existieren, der mit zunehmender Ouabainkonzentration im Medium oder über einen kosezernierten Faktor im Zellkulturüberstand die

Ouabainsekretion hemmt [50]. Steigender Serumgehalt des Kulturmediums führt ebenfalls zu geringfügig abnehmender Ouabainsekretion [165].

Das Ausmaß der Steigerung der Freisetzung von endogenem Digitalis und Aldosteron durch Nebennierenrindenzellen in Mischkultur ist ähnlich. Wenn bei jeweils 10 nanomolarer Konzentration an ACTH bzw. Angiotensin II die Freisetzung von Cortisol, Aldosteron oder Ouabain gemessen wurde [50], dann zeigte sich eine:

Sekretionssteigerung von endogenem Digitalis:	um das 4-fache,
Sekretionssteigerung von Aldosteron:	um das 5-fache,
Sekretionssteigerung von Cortisol:	um das 14-fache.

Bei getrenntem Anlegen von Zona glomerulosa- und Zona fasciculata-Zellen stellten sich die Verhältnisse anders dar: Der stimulierende Effekt des ACTH war mit Zona glomerulosa-Zellkulturen geringer als mit gemischten Kulturen (hier waren ACTH und Angiotensin II gleich wirksam), woraus auf eine parakrine Wirkung bei Zona fasciculata-Monokulturen geschlossen wurde [53].

Da Ouabain, Aldosteron und Cortisol in Nebennierenrinde und Nebennierenmark in unterschiedlichen zellulären Konzentrationen vorkommen [50], bewirkt eine Stimulierung der Sekretion der 3 Hormone unterschiedliche Freisetzungsraten sowie unterschiedliche Zeitverläufe dieses Freisetzungsverhaltens in einer Mischzellkultur. Die Tatsache, dass die Zeitverläufe bei stimulierter Sekretion unterschiedlich verlaufen, lässt auf verschiedene Sekretions- bzw. Regulationsmechanismen schließen [50]. Im Gegensatz zu Ouabain scheint die Sekretion des Cortisols und des Aldosterons von der bereits sezernierten Menge unabhängig zu sein [50].

Bei einer Stimulation der Ouabainsekretionsrate war gleichzeitig keine Veränderung des intrazellulären Ouabaingehaltes in den Rinder-Nebennierenrindenzellen messbar, woraus die Arbeitsgruppe um Laredo schließt, dass jede Sekretionsstimulation entweder eine *de novo* Biosynthese darstellt oder aber auf der Umwandlung einer intrazellulären, selbst nicht immunoreaktiven Ouabain-Vorstufe in das aktive Steroid beruht [50].

## 2.2. Steroidhormone

Steroidhormone sind Cholesterolabkömmlinge mit einem Sterangerüst aus 21 C-Atomen, die *in-vivo* als Hormone wirken. Die vier mit A, B, C und D bezeichneten Steroidringe sind bei allen Steroidhormonen trans-trans-trans verknüpft und unterscheiden sich dadurch sowohl von den Gallensäuren als auch von den kardiotonen Steroiden (vgl. Kap. 2.1.2.1). Die Steroidhormone lassen sich in fünf verschiedene Gruppen einteilen: Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene, Östrogene und Gestagene. Die gemeinsame Ausgangssubstanz für die z.B. in den Gonaden und in der Nebenniere stattfindende Steroid-biosynthese ist das Cholesterol.

In der menschlichen Nebennierenrinde werden mindestens 50 verschiedene Steroide synthetisiert. Es sind dies die:

- 1) Glucocorticoide (z.B. Hydrocortison);  
Stresshormone, welche die Blutglucose-Konzentration durch Stimulierung der Gluconeogenese und durch die Bereitstellung von Energiesubstraten aus dem Protein- und Lipidstoffwechsel erhöhen. Sie unterdrücken die Immunantwort.
- 2) Mineralocorticoide (z.B. Aldosteron);  
sie dienen der Regulation der Wasser- und Salzausscheidung über die Nieren.
- 3) Androgene und Östrogene (z.B. Testosteron bzw.  $\beta$ -Östradiol);  
sie steuern die sexuelle Entwicklung und Gonadenfunktion und werden vorwiegend in den Geschlechtsorganen synthetisiert.

Steroidhormone sind schwer wasserlöslich und werden im Blut als Komplex mit dem Glycoprotein Transcortin, zu einem geringen Anteil auch an Albumin gebunden, transportiert. Aufgrund ihrer hohen Lipidlöslichkeit sollen die Steroidhormone ungehindert durch die Zellmembran hindurch in das Zytoplasma der Zielzelle permeieren. Dort binden sie an zytoplasmatische Steroid-Hormon-Rezeptoren. Diese verfügen über einen steroid-bindenden Anteil (steroid-binding-domain) und eine an die DNA bindende Domäne (DNA-binding-domain). Der Hormon-Rezeptor-Komplex bindet an bestimmte Bereiche auf der DNA (hormone-response-elements) und beeinflusst so die Regulation der Transkription als Transkriptions-Enhancer oder -Inhibitor.

Da die Voraussetzung für die Rezeptoraktivierung an die Struktur des Liganden gekoppelt ist, wurden eine Reihe synthetischer Steroide und auch nicht-steroidaler Moleküle entwickelt, die ähnlich den physiologischen Steroidhormonen in der Lage sind, an die Rezeptoren zu binden und in die Regulation der zellulären Transkription einzugreifen.

In unseren Untersuchungen zur Ouabainsekretion und -biosynthese wurde als Vergleichsparameter zur Charakterisierung der Zellvitalität die Abgabe des Glucocorticoids Cortisol gewählt. Gleichzeitig ergaben sich aus diesem Vergleich auch Hinweise auf ein gemeinsames bzw. unterschiedliches Synthese- und Freisetzungsverhalten der beiden Steroidhormone.

### 2.2.1. Glucocorticoide

Die Nebennierenrinde enthält mindestens drei verschiedene endokrine Zelltypen, deren Synthesefähigkeit sich jeweils auf einen bzw. mehrere Steroide spezialisiert hat. Es sind dies die Zellen der (vgl. Kap. 4.1, Abb. 15):

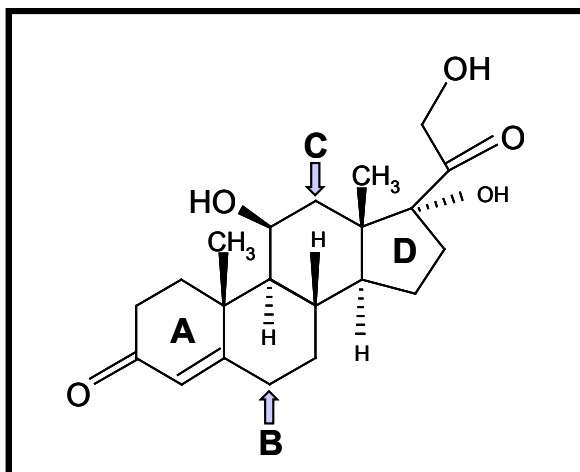
Zona glomerulosa: Mineralocorticoide (Aldosteron), kardiogene Steroide,

Zona fasciculata: Glucocorticoide (v.a. Cortisol), kardiogene Steroide,

Zona reticularis: Glucocorticoide, Androgene (v.a. Testosteron).

Das physiologische Glucocorticoid ist das Cortisol (Abb. 11), auch Hydrocortison genannt.

Die Ausscheidung der Glucocorticoide erfolgt nach Hydrierung, Glucuronidierung bzw. Sulfatierung durch renale Elimination.



**Abb. 11: Cortisol (Hydrocortison,  $C_{21}H_{30}O_5$ ), ein Glucocorticoid**

### 2.2.2. Geschichte der Glucocorticoide

Mit der Verleihung des Nobelpreises (1950) für Physiologie und Medizin an die Amerikaner Edward Calvin Kendall und Philip Showalter Hench sowie an den Schweizer Tadeus Reichstein wurde ein für die Nebenniere als endokrines Organ wichtiger Meilenstein gesetzt.

Im 17. Jahrhundert wurde die Funktion der Nebenniere lediglich als Platzhalter zwischen Niere und Zwerchfell beschrieben (Adrianus Spigelius). Erst der Arzt Thomas Addison brachte anatomisch-pathologische Veränderungen (Tumoren, Tuberkulose oder Autoimmunreaktionen) mit einer beeinträchtigten Nebennierenrindenfunktion in Verbindung. Er fasste die Symptome als Syndrom zusammen und bezeichnete dies nach seinem Namen als Addison-Krankheit. Die Physiologen Charles-Edouard Brown-Sequard und Arthur Biedel kamen tierexperimentell zu den gleichen Resultaten.

Nebennierenextrakte und vor allem Nebennierenrindenextrakte wurden daraufhin bis in die 40er Jahre des letzten Jahrhunderts erfolgreich zur Therapie der mangelhaften Nebennierenrindenfunktion (Nebennierenrindeninsuffizienz) und damit auch der Addison-Krankheit eingesetzt.

Der Unterschied zwischen Mark- und Rindenzone wurde von Edward C. Kendall (Rochester), Otto Wintersteiner (New York) und Tadeus Reichstein (Zürich) als Anlass genommen, die Nebennierenrinde genauer zu untersuchen.

1936 gelang allen drei Arbeitsgruppen die Isolierung von 17-Hydroxy-11-dehydrocorticosteron, das später als Cortison bezeichnet wurde. 1937 entdeckten Kendall und Wintersteiner das biologisch wirksame Glucocorticoid „Cortisol“. Tadeus Reichstein wies 1936 die Existenz der Nebennierenandrogene und 1953 das Mineralocorticoid Aldosteron nach, was von der Entdeckung von insgesamt 39 weiteren Corticoiden (durch verschiedene Arbeitsgruppen) bis 1946 begleitet wurde. Eine Substanzgruppe zeigte eine bevorzugte Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels, die deswegen als „Glucocorticoide“ bezeichnet wurden. Den „Mineralocorticoiden“ wurde dieser Name aufgrund ihrer Beteiligung an der Regulation des Wasser- und Mineralhaushaltes gegeben.

In den 50er Jahren wurde der Begriff „Stress“ durch den Physiologen Hans Selye, Montreal, [175] geprägt. Erstmals wurden physiologische Veränderungen im Organismus unter Belastungszuständen beschrieben und es wurde die Hypothese eines Regelkreises zwischen Hypophysen- und Nebennieren-Achse aufgestellt. Störungen des Hormon-Regelkreises unter Stress schienen die Krankheitserscheinungen zu erklären.



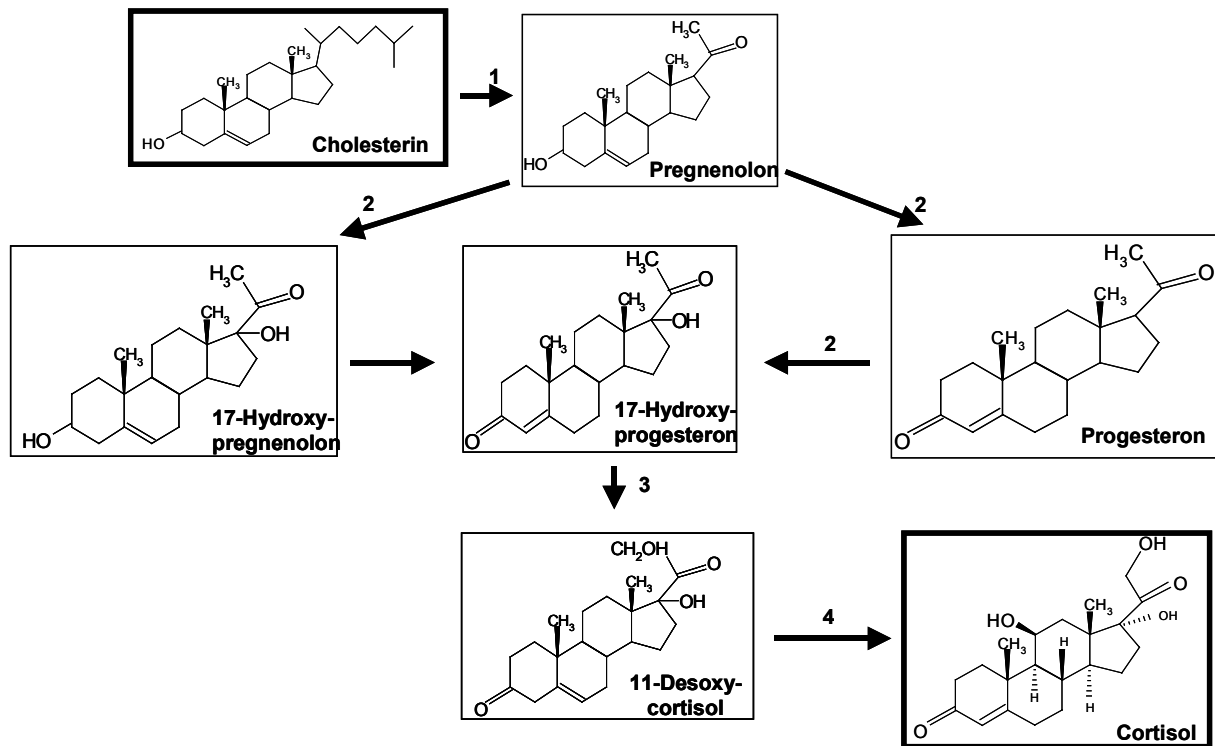
Um mit reinem Cortison experimentieren zu können, isolierte Kendall aus 1.936.500 kg Nebennieren von 20.000 Rindern 1 g Cortison. 1929 entdeckte man erste Hinweise auf die entzündungshemmende Wirkung der Glucocorticoide. Nachdem im gleichen Jahr die industrielle Produktion möglich geworden war, setzte man die Hormone erstmalig 1948 bei Polyarthritiden- und Rheumapatienten therapeutisch ein. Durch den weit verbreiteten und oft vorschnellen Einsatz kam man aber auch zu der Erkenntnis, dass negative Wirkungen, wie die Störung des Elektrolyt und Wasserhaushaltes, existieren, gemeint waren damit das iatrogene Cushing-Syndrom und die iatrogene Immunsuppression.

Vor allem die pharmazeutische Industrie konzentrierte sich daher auf die Entwicklung stärkerer Glucocorticoide mit verminderter mineralocorticoider Wirkung (z.B. Dexamethason mit 37-facher antiphlogistischer Wirkung und vernachlässigbar geringen Auswirkungen auf den Wasser- und Elektrolythaushalt).

### **2.2.3. Biosynthese des Cortisols**

Für die in der Zona fasciculata und der Zona reticularis stattfindende Biosynthese der Glucocorticoide lassen sich 5 Abschnitte erkennen. Für diese sind Cytochrom-P450 Monoxygenasen erforderlich [176, 177], (Abb. 12, Abb. 13). Im Einzelnen besteht die in Abb. 12 und 13 aufgeführte Biosynthese des Cortisols aus den folgenden Schritten:

- 1) Die Seitenkettenabspaltung des Cholesterols durch die Cholesterol-Desmolase (Cytochrom P450<sub>scc</sub>) um Pregnenolon zu bilden.
- 2) Die Konversion von Pregnenolon durch die 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/3-ketosteroid  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase) zu Progesteron [178].
- 3) Sukzessive Hydroxylierungen an den Positionen: 17 $\alpha$ , 21 und 11 $\beta$ , die jeweils durch Cytochrom P450-Enzyme vermittelt werden.



**Abb. 12: Vereinfachtes Schema der Biosynthese des Cortisols:** 1: Seitenkettensplattendes Enzym, P450scc; 2: Steroid-C(17)-Hydroxylase (3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/3-ketosteroid  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase); 3: Steroid-C(21)-Hydroxylase; 4: Steroid-11 $\beta$ -Hydroxylase (nach New, 1998 [176]; Temple und Liddle, 1970 [177]).

**Abb. 13 (auf folgender Seite): Übersicht über die Steroidogenese adrenocorticaler Hormone und die daran beteiligten Enzyme.** Grau unterlegt: Biosynthese des Cortisols nach [176], [177]. P450scc: Cholesterol 20,22-Desmolase (side-chain-cleavage-enzyme); 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase/3-ketosterid  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase; P450c17: a) Steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase, b) 17,20-lyase; P450c21: Steroid 21-hydroxylase; P450arom: P450-Aromatase; P450c11: a) Steroid 11 $\beta$ -hydroxylase, b) Steroid 18-hydroxylase (Corticosteron-methyl-oxidase Typ I; CMO I), c) 18-oxidase oder Aldosteronsynthase (Corticosteron-methyl-oxidase Typ II; CMO II). (\* bisher nicht näher charakterisiertes Enzym.)

## Steroidogenese adrenocorticaler Hormone:

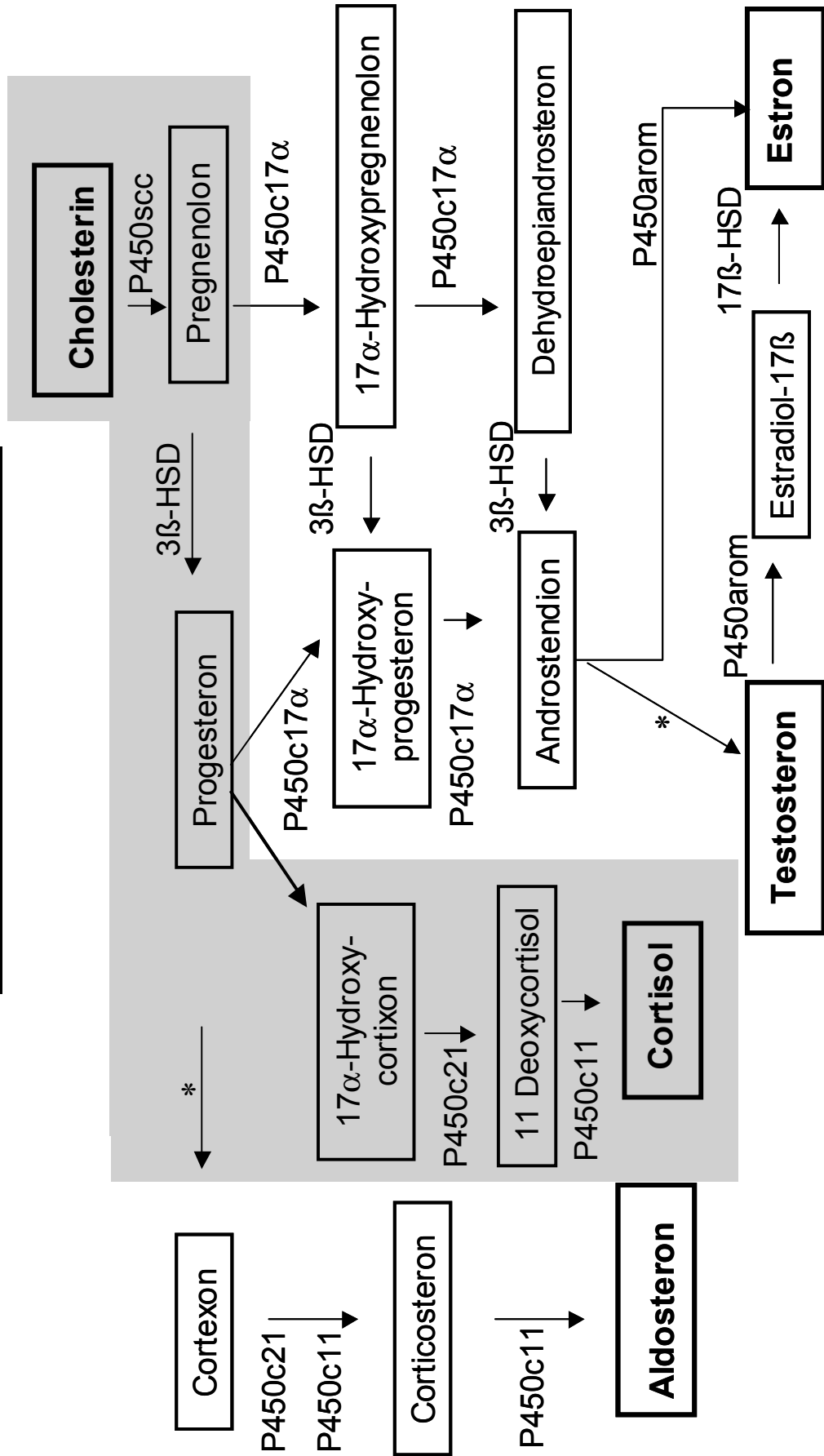


Abb. 13

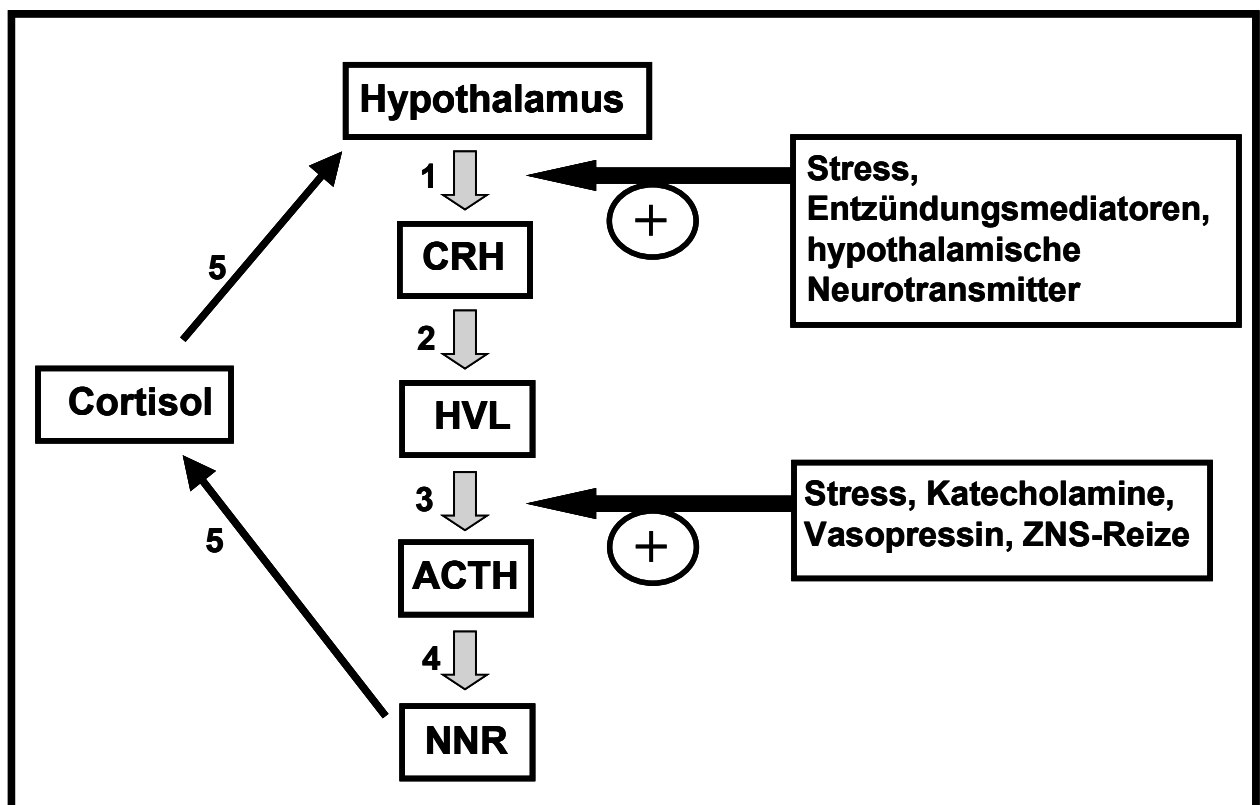
## **2.2.4. Die Ausschleusung des Cortisols aus der Nebennierenrindenzelle**

Der Mechanismus der Freisetzung des Cortisols aus den Nebennierenrinden-Zellen ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Nachdem man aufgrund der Lipophilie des Cortisols lange Zeit von einer einfachen Diffusion ausging, gibt es inzwischen Hinweise darauf, dass an der Cortisolsekretion das P-Glycoprotein beteiligt ist [179]. Es handelt sich hierbei um das Genexpressionsprodukt des MDR1-Gens. Auf der Suche nach Transportern, die für die Vielfachresistenz gegenüber Pharmaka (MDR = multidrug-resistance) verantwortlich sind [180], wurde eine Transportergruppe gefunden, die zur Familie der ABC-Transporter gehört. Alle diese Transporter sind ATP abhängig und haben eine hochkonservierte gemeinsame Domäne (ABC = ATP-binding-cassette Protein). Das P-Glycoprotein gehört zur Familie der ABC-Transporter. P-Glycoprotein arbeitet als Efflux-Pumpe und schleust hydrophobe Steroide und Xenobiotika aus der Zelle aus [181, 182]. Es kommt sowohl in der Niere und der Leber als auch im Dünndarm, Colon und in Endothelzellen von Gehirnkapillaren vor. Sein Expressionsgrad ist jedoch in der Nebennierenrinde besonders hoch [181]. Im Gehirn fand man Unterschiede zwischen dem Cortisol- und dem Corticosteron-Transport durch die Nervenzellmembran, die auf die Aktivität des MDR1 an der Bluthirnschranke zurückgeführt werden [183].

Kürzlich wurde aus der Gruppe der sogenannten organic anion transporter der OAT3 in Bezug auf seine Beteiligung an der Cortisolfreisetzung aus Zellen einer humanen Nebennieren-Zelllinie untersucht [184]. OATs gehören im Gegensatz zu den primär aktiven Transportern zu den sekundär bis tertiär aktiven. Sie transportieren vorwiegend kleine, hydrophile, organische Anionen und könnten als Cortisol-Anionen-Austauscher arbeiten [184].

### 2.2.5. Regulation der Freisetzung und Biosynthese des Cortisols

Die Regulation der Cortisolsekretion der Nebennierenrinde erfolgt über einen hypothalamo-hypophyseo-adrenalen Regelkreis [176, 185], (Abb. 14). Die Zellen des Nucleus paraventricularis der Eminentia mediana des Hypothalamus setzen das Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) frei. Über das Portalgefäß-System gelangt das CRH zur Hypophyse und aktiviert dort basophile Zellen, sodass es zu einer Freisetzung von ACTH kommt. Über den systemischen Blutkreislauf löst ACTH an der Nebennierenrinde sowohl die Cortisolsynthese als auch die Cortisolfreisetzung aus. Das in den Blutkreislauf freigesetzte Cortisol hemmt am Hypothalamus und an der Hypophyse die weitere Stimulierung der Freisetzung von Cortisol aus der Nebenniere. Dieser Regelkreis wird durch Stress, Katecholamine, Entzündungsmediatoren, hypothalamische Neurotransmitter, Vasopressin und verschiedene zentralnervöse Reize beeinflusst (Abb. 14).



**Abb. 14: Hypothalamo-hypophyseo-adrenaler Regelkreis der Cortisolbiosynthese und –freisetzung.** CRH: Corticotropin-Releasing Hormon; HVL: Nucleus paraventricularis des Hypophysenvorderlappens; ACTH: Adrenocorticotropes Hormon; NNR: Zellen der Nebennierenrinde; 1: Basalsekretion mit zirkadianer Rhythmik; 2: Portalgefäßsystem; 3,4,5: Systemischer Blutkreislauf.

In den Nebennierenrindenzellen spielen sogenannte StAR-Proteine (steroid acute regulatory proteins) sowohl für die Stimulation der Cortisolfreisetzung als auch für die Cortisolbiosynthese mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten eine große Rolle: StAR-Proteine werden nur in der Nebenniere und in den Gonaden exprimiert und spielen eine Schlüsselrolle in der hormoninduzierten steroidogenen Antwort von steroidogenen Zellen [186-188].

ACTH und Angiotensin II lösen über eine erhöhte Expression der StAR m-RNA eine Zunahme des StAR-Proteins aus [189]. Über eine intrazelluläre Calciumerhöhung (durch  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierende Substanzen oder Angiotensin II [184]) ist ein Anstieg von StAR in Mitochondrienextrakten innerhalb von 1,5 bis 3 Stunden nachweisbar [189, 190]. StAR-Proteine wandern durch die äußere Mitochondrienmembran und sammeln sich an der inneren Mitochondrienmembran.

Gleichzeitig katalysieren sie den Transport von Cholesterol von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran und erhöhen so die Menge der Ausgangssubstanz für die Cortisolbiosynthese. Der limitierende Schritt der Cortisolbiosynthese besteht nicht in einer Enzymaktivität, sondern in der Verfügbarkeit einer ausreichenden Cholesterolmenge [189]. Über ACTH wird c-AMP erhöht, das seinerseits die Proteinkinase A (PKA) aktiviert und so die Freisetzung des Cortisols auslöst: c-AMP aktiviert SF-1, einen sogenannten steroidogenen Bindungsfaktor 1, der zusätzlich die Expression der StAR-Gene erhöht und somit ebenfalls zu einer Stimulation der Cortisolbiosynthese führt [189, 191]. Extrazelluläres ATP potenziert diesen steroidogenen Effekt des ACTHs [192].

ACTH löst damit einerseits eine direkte Stimulation der StAR-Genexpression und eine gesteigerte Biosynthese aus; andererseits bewirkt es über die Erhöhung von c-AMP eine gesteigerte Sekretion von Cortisol und eine zusätzliche Stimulation der StAR-Genexpression. ACTH stimuliert damit die Cortisol-Freisetzung und die Cortisolbiosynthese nachhaltig.

Angiotensin II bewirkt eine Erhöhung der Phospholipid- und Calcium-abhängigen Proteinkinase C (PKC) und beeinflusst damit die Regulation der Aldosteron-Produktion. Dennoch kommt es auch über Angiotensin II zu einer Aktivierung der StAR-Proteine mit nachfolgender Stimulation der Cortisolbiosynthese [189].

### **3. Material**

#### **3.1. Versuchsorgane und Zelllinien**

##### **3.1.1 Versuchsorgane**

Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension boviner Nebennierenrindenzellen wurden Nebennieren der Tierart Rind vom Schlachthof Gießen verwendet. Die Organe stammten überwiegend von geschlachteten Schwarzbunten Milchkühen, die älter als 24 Monate waren. Die Tiere kamen von Höfen in der näheren Umgebung und wurden meist direkt vor der Schlachtung angeliefert. Die Nebennieren wurden spätestens 10 Minuten nach dem Tod des Tieres entnommen. Sie hatten eine durchschnittliche Größe von 6 x 3 cm und ein durchschnittliches Gewicht von 22 g.

Um die für die Versuche erforderliche Zellzahl zu erhalten, wurden maximal 2 Nebennieren gleichzeitig präpariert und mit Kollagenase perfundiert.

##### **3.1.2 Die PC12-Zelllinie**

PC12-Zellen stammen aus einer Phäochromocytom-Zelllinie der Ratte [193] und wurden von der American Tissue Type Cell Collection (Rockville, MD, USA) bezogen. Sie stellen eine stabile Nebennierenmarkzelllinie dar.

##### **3.1.3 Die humane Nebennierenrinden-Zelllinie (NCI-295R)**

Die Zellen der NCI-295R stammen von einer Patientin, bei der im Oktober 1980 ein Nebennierenrindentumor diagnostiziert wurde. Gazdar et al. erarbeiteten aus diesen Zellen eine NCI-H295 pluripotente Nebennierenrindenkarzinom-Zelllinie. Da die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen im Besitz dieser Zellen ist, wurden die für Kap. 7.5.3. durchgeführten Untersuchungen freundlicherweise von dem dort tätigen Herrn Dr. A. R. Asif vorgenommen.

## 3.2. Präparationsausstattung

### 3.2.1 Material und Geräte

⇒ Acryl-Küvetten	<i>Sarstedt G &amp; Co., Nümbrecht</i>
⇒ <u>Glasbehältnisse:</u>	
→ Perfusionsbehältnisse (Schimassek, 1963)	<i>Ströhmman Glastechnik, Herborn</i>
→ 250 ml Rundkolben	<i>Schott Glas Duran®, Mainz</i>
⇒ <u>Operationsbesteck:</u>	
→ Metzenbaumschere	<i>Hebu GmbH, Weilheim</i>
→ Chirurgische und anatomische Pinzetten	<i>Hebu GmbH, Weilheim</i>
→ Einmalskalpell	<i>Swann-Morton®, Sheffield, England</i>
→ Angiocath® (1,7 mm; 8,3 cm)	<i>Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
→ Mercifil Dominator 12 Baumwollzwirn	<i>Amann &amp; Söhne GmbH &amp; Co., Bönningheim</i>
⇒ pH-Meter, Modell SA 720	<i>Orion Research Inc., Boston USA</i>
⇒ Photometer Eppendorf® 1101M	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
⇒ Reaktionsgefäße (1,5ml; 2 ml)	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
⇒ Silikonschläuche	<i>Deutsch &amp; Neumann GmbH, Berlin</i>
⇒ Sterile Zellsiebe: 70 µm Maschenweite	<i>Fisher Scientific GmbH, Nidderau</i>
⇒ Verbandmull	<i>Lohmann GmbH &amp; Ko. KG, Neuwied</i>
⇒ <u>Waagen:</u>	
→ Mettler AE 260 Delta Range®	<i>Mettler-Toledo, Gießen</i>
→ Mettler P 1200	<i>Mettler-Toledo, Gießen</i>
⇒ <u>Zentrifugen:</u>	
→ Tischzentrifuge mit Festwinkelrotor für 20 Reaktionsgefäße (2ml)	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
→ Tischzentrifuge Universal 2S mit Festwinkelrotor für 4 x 50 ml Zentrifugenbecher	<i>Andreas Hettich GmbH &amp; Co.KG, Tuttlingen</i>
→ Tischzentrifuge Hermle Z 364 mit Schwingbecherrotor für 4 x 50 ml Zentrifugenbecher (Läufertyp des Rotors: 20.27.00)	<i>Hermle Labortechnik, Wehingen</i>
⇒ Zentrifugenbecher 50 ml, Sorvall	<i>Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau</i>

### 3.2.2 Chemikalien und Enzyme

⇒ Ovalbumin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Bio-Rad Proteinassay	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
⇒ Calciumchlorid-Dihydrat	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>



⇒ Kollagenase:

→ Worthington Biochemical corporation  
Kollagenase Typ CLS II (362 U/mg)

*Cellsystems Biotechnologie Vertrieb GmbH,  
St. Katharinen*

→ Worthington Biochemical corporation  
Kollagenase Typ 2 CLS2 (304 U/mg)

*Biochrom KG, Berlin*

⇒ D(+)-Glucose wasserfrei

*Merck KGaA, Darmstadt*

⇒ HEPES

*Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe*

⇒ Kaliumchlorid

*Merck KGaA, Darmstadt*

⇒ Kaliumdihydrogenphosphat

*Merck KGaA, Darmstadt*

⇒ Magnesiumsulfat-Heptahydrat

*Merck KGaA, Darmstadt*

*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen*

⇒ Natriumchlorid

*Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe*

⇒ Natriumhydrogencarbonat

*Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg*

⇒ Natriumhydroxid Plättchen

*Merck KGaA, Darmstadt*

⇒ Percoll

*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen*

⇒ Salzsäure konzentriert, 32%

*Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe*

⇒ Titriplex® VI (EGTA)

*Merck KGaA, Darmstadt*

⇒ Trypanblau

*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen*

### 3.2.3 Pufferlösungen

#### Krebs-Henseleit-Puffer: $\text{Ca}^{2+}$ -frei mit EGTA

	<u>mM</u>	<u>g/L</u>
NaCl	115,0	6,70
KCl	4,7	0,34
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,2	0,29
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	0,16
NaHCO <sub>3</sub>	25,0	1,05
EGTA	5,0	1,90

Aqua bidest ad 1 l

pH-Korrektur mit HCl/NaOH auf pH 7,4

Osmolarität: 292,66 mosmol/l

#### Krebs-Ringer-Puffer:

Spül-Lösung

	<u>mM</u>	<u>g/L</u>
NaCl	115,0	6,70
KCl	4,7	0,35
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,56	0,37
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,2	0,295
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	0,16
HEPES	16,0	3,8
NaHCO <sub>3</sub>	20,0	1,7
Glucose	11,7	2,1

Aqua bidest ad 1 l

pH-Korrektur mit HCl/NaOH auf pH 7,4

Osmolarität: 319,33 mosmol/l

#### Krebs-Ringer-Puffer:

Resuspendier-Lösung

	<u>mM</u>	<u>g/L</u>
NaCl	115,0	6,7
KCl	4,7	0,35
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,56	0,37
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,2	0,295
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	0,16
HEPES	16,0	3,8
NaHCO <sub>3</sub>	20,0	1,7
Glucose	23,4	4,2

Aqua bidest ad 1 l

pH-Korrektur mit HCl/NaOH auf pH 7,4

Osmolarität: 323,66 mosmol/l

**Kochsalz-Lösung:**

	<u>M</u>	<u>g/L</u>
NaCl	1,5	87,7

**Kochsalz-Lösung:**

	<u>M</u>	<u>g/L</u>
NaCl	0,15	8,77

### 3.2.4 Chemikalien

⇒ $\alpha$ -Ketoglutarat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ 2-Propanol	<i>Karl Roth GmbH &amp; Co., Karlsruhe</i>
⇒ ACTH (porcines)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Angiotensin II	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Antimycin A	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ BSP	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Cortisol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Cyclosporin A	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ D-Aldosteron	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ DMSO	<i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i>
⇒ Ethanol absolut	<i>Riedel-de Haën Laborchemikalien GmbH &amp; Co. KG, Seelze</i>
⇒ Forskolin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Kaliumhydroxid-Plätzchen	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
⇒ Malonsäure	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Malonyl-CoA	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Methanol	<i>Karl Roth GmbH &amp; Co., Karlsruhe</i>
⇒ Natriumhydroxid-Plätzchen	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
⇒ Oligomycin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Ouabain	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Phenylephrin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Pregnenolon	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Progesteron	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Propionsäure	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Valeriansäure	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Valerolacton	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>

### 3.3. Zellkulturbedarf

#### 3.3.1 Material und Geräte

⇒ 25 ml, 10 ml, 5 ml Glaspipetten	<i>Brand GmbH &amp; Co. KG, Wertheim</i>
⇒ Laminar-Flow: DanLAF® VFR 1806	<i>Claus Damm, Fredensborg Dänemark</i>
⇒ Pipettboy	<i>Tecnomara AG, Wallisellen Schweiz</i>
⇒ Sterilfilter DynaGard® 0,2 $\mu$ m ME	<i>Microgon Inc., Laguna Hills USA</i>
⇒ Tischzentrifuge Eppendorf 5415 mit einem Festwinkelrotor 18 x 3,5g	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
⇒ Wärmeschrank KI 500-E	<i>Haereus, Hanau</i>

- |  |  |
|--|--|
| ⇒ Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> ) | <i>Sarstedt AG &amp; Co., Nümbrecht</i>  |
| ⇒ Zellkulturflaschen (80 cm <sup>2</sup> ) | <i>Nunc GmbH &amp; Co. KG, Wiesbaden</i> |

### 3.3.2 Chemikalien und Enzyme

- |   |   |
|---|---|
| ⇒ Accutase, L11-007                     | <i>PAA Laboratories, Linz</i>                 |
| ⇒ Aceton                                | <i>Merck KGaA, Darmstadt</i>                  |
| ⇒ DMSO                                  | <i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i> |
| ⇒ Kollagen, Nr. 47254                   | <i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i> |
| ⇒ Trypsin/EDTA (Ethyldiamintetraacetat) | <i>GibcoBRL, Eggenstein</i>                   |

### 3.3.3 Kulturmedien und -zusätze

- |   |   |
|---|---|
| ⇒ α-Tocopherol                                      | <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i> |
| ⇒ BHA (Butylated Hydroxyanisole)                    | <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i> |
| ⇒ DMEM-Medium                                       | <i>GibcoBRL, Eggenstein</i>                   |
| ⇒ Fetales Kälberserum                               | <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i> |
| ⇒ Glutamin  | <i>GibcoBRL, Eggenstein</i>                   |
| ⇒ Ham's F12-Medium                                  | <i>GibcoBRL, Eggenstein</i>                   |
| ⇒ Insulin   | <i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i> |
| ⇒ Penicillin/Streptomycin                           | <i>GibcoBRL, Eggenstein</i>                   |
| ⇒ Pferdeserum, Nr. 16050-122                        | <i>Gibco BRC, Karlsruhe</i>                   |
| ⇒ RPMI 1640, E15-840                                | <i>PAA Laboratories, Linz</i>                 |
| ⇒ Selenige Säure (H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ) | <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i> |

### 3.3.4 Kulturmediumzusammensetzung für bovine Nebennierenrinden- und bovine Nebennierenmarkzellen

Vorlösen der Antioxidantien:

<u>Substanz</u>	<u>Einwaage/pro Volumen des Lösungsmittels</u>
⇒ H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	149,3 µg / 100 µl PBS
⇒ Vit. E	980,0 µg / 200 µl Aceton
⇒ BHA	19,7 mg / 5,5 ml 70% Ethanol
⇒ Insulin*	146,4 µg / 500 µl Medium-Gemisch (Insulin wird zuletzt hinzugegeben; vgl. Anmerkung zu Insulin)

<u>Substanz</u>	<u>Zusammensetzung für 1L Volumen</u>	<u>Insulin*:</u> Abwiegen des Insulins
⇒ DMEM	427 ml	⇒ Aufziehen von Mediumgemisch (500 µl bei 146,4 µg Insulin) in eine sterile Insulin-Spritze und Mischen mit dem abgewogenen Insulin
⇒ Ham F12	427 ml	
⇒ FKS	100 ml	⇒ 5 µl 32%ige HCl zusätzlich zugeben, um das Insulin besser lösen zu können
⇒ Pen/Strep	20 ml	⇒ Aufziehen dieses Insulin-Mediumgemisches durch Bakterienfilter und in neues Gefäß hineinpipettieren (filtrieren)
⇒ L-Glutamin	20 ml	
⇒ H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	4,3 µl	
⇒ Vit. E	125 µl	
⇒ BHA/Strep	5 ml	
⇒ Insulin*	400 µl	⇒ von diesem Filtrat 400 µl zum Medium-Hauptansatz hinzugeben.

### 3.3.5 Kulturmediumzusammensetzung für PC12-Zellen

<u>Substanz:</u>	<u>Einzusetzendes Volumen [ml]</u>
⇒ Pferdeserum	50 ml
⇒ Fetales Kälberserum	25 ml
⇒ Penicillin/Streptomycin	5 ml
⇒ RPMI 1640, E15-840	Ad 500 ml

## 3.4. ELISA

### 3.4.1 Material und Geräte

⇒ Benchmark Microplate Reader	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
⇒ IS220-0050-H Isolute C-18 500mg/10ml	<i>ICT Handels-GmbH, Bad Homburg</i>
⇒ Mikrowellplatten mit 8 x 12 flachen Vertiefungen	<i>Nunc GmbH &amp; Co.KG, Wiesbaden-Biebrich</i>
⇒ Neoaccupette® 1-100 ml	<i>NeoLab, Heidelberg</i>
⇒ <u>Pipetten:</u>	
Mehrkanalpipette: 8 x 50-1200 µl	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Mehrkanalpipette: 8 x 5-50 µl	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Eppendorf Research: 100-5000 µl	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Mehrkanalpipette: Pipetman 8 x 20-200 µl	<i>Gilson Inc., Middleton USA</i>
⇒ Savant Speed Vac® SPD111V	<i>SAVANT Instruments, Inc. Holbrook, NY (USA)</i>
⇒ Supelco Model 5-7030 Vacuum Manifold	<i>Supelco Inc., Pennsylvania USA</i>
⇒ Titramax 100	<i>Heidolph Instruments, Berlin</i>

### 3.4.2. Chemikalien und Enzyme

⇒ 4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat	<i>Applichem GmbH, Darmstadt</i>
⇒ Acetonitril Roti®Solv HPLC Gradient Grade	<i>Karl Roth GmbH &amp; Co., Karlsruhe</i>
⇒ Alkalische Phosphatase-Streptavidin (016-050-084)	<i>Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Pennsylvania USA</i>
⇒ Antigen: Ouabain-C <sub>6</sub> -Trypsin	<i>Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. W. Schoner, Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (Harris, D.W. et al., 1991)</i>
⇒ <u>Antikörper:</u>	
→ primärer Antikörper aus dem Schaf gegen Ouabain	<i>Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. W. Schoner, Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus-Liebig-Universität Gießen</i>
→ Sekundärer Antikörper : Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti Sheep (H+L) Code: 713-065-003	<i>Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Pennsylvania USA</i>
⇒ Diethanolamin	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
⇒ EIA Grade Reagent Gelatin	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
⇒ Magnesiumchlorid-Hexahydrat	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
⇒ Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	<i>Riedel-de Haën Laborchemikalien GmbH &amp; Co. KG, Seelze</i>
⇒ Natriumcarbonat SigmaUltra, wasserfrei	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen</i>
⇒ Natriumhydrogencarbonat	<i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i>
⇒ Trifluoressigsäure	<i>Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz</i>
⇒ Tris ultrapure	<i>ICN Biomedicals GmbH, Eschwege</i>
⇒ Tween® 20 rein	<i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i>

### 3.4.3. Pufferlösungen

#### TBS-Puffer

	<u>mM</u>	<u>g/L</u>
NaCl	150	8,76
Tris	100	12,1
Aqua bidest ad 1 l		
pH-Korrektur mit HCl/NaOH auf pH 7,4		

#### Beschichtungspuffer

	<u>mM</u>	<u>g/L</u>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15	1,59
NaHCO <sub>3</sub>	35	2,93
Aqua bidest ad 1 l		
pH-Korrektur mit HCl/NaOH auf pH 9,6		

#### TBS-Tween Puffer

		<u>g/L</u>
NaN <sub>3</sub>	0,1%	1,0
Tween	0,1%	1,0
Gelöst in TBS-Puffer, pH 7,4		

#### TBS-Gelatine Puffer

		<u>g/L</u>
EIA Gelatine	1%	10
Gelöst in TBS-Puffer, pH 7,4		

**Lösung für das Substrat**

(zur Lösung des Substrats: 4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat)

	<u>mM</u>	<u>g/L</u>
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,5	0,102
Diethanolamin	10	1,05

Aqua bidest ad 1 l

pH-Korrektur mit HCl/NaOH auf pH 9,5

Das Substrat (4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat) wird in einer Konzentration von 1mg/1ml Lösung kurz vor Verwendung gelöst.

**NaOH-Lösung zum Abstoppen der Enzym-Substrat-Reaktion**

	<u>N</u>	<u>g/L</u>
NaOH	3	119,9

### 3.5. Durchflusszytometrische Untersuchung

EPICS <sup>TM</sup> Elite Analyser  
 488 nm Argonlaser, Standardfilterkombination  
 (488 nm Seitwärtsstreulicht, 525 nm für  
 Fluoreszenz 1 (Fl. 1), 575 nm für Fl. 2 und 630 nm  
 für Fl. 3  
 Software: Gerätespezifisches Computerprogramm  
 Elite, Version 4.01

*Beckmann-Coulter GmbH,  
 Krefeld,*

## **4. Methoden**

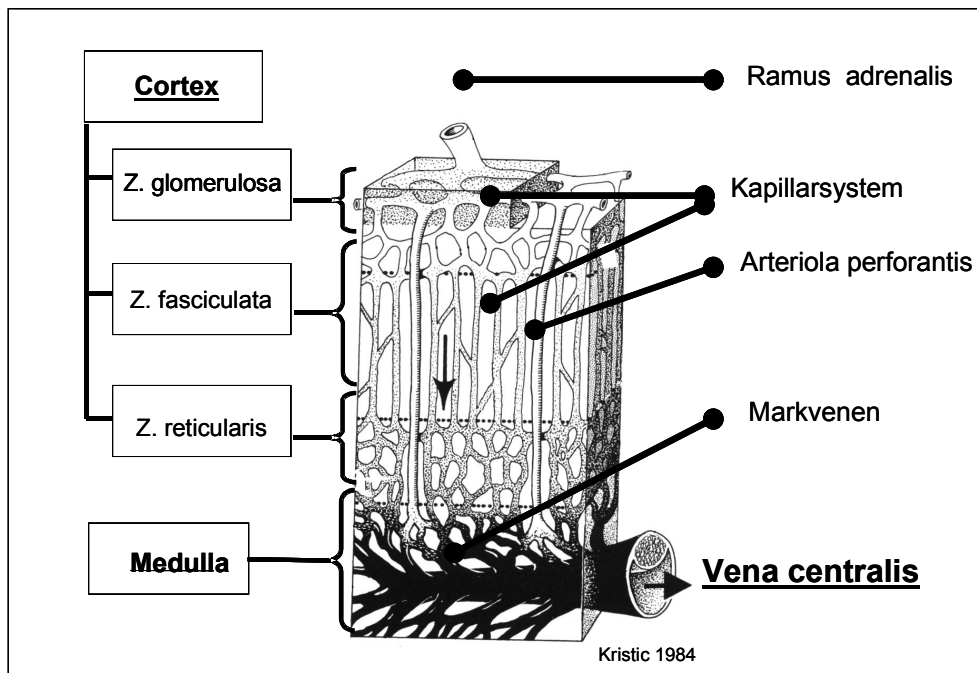
### **4.1. Präparation von bovinen NNRZ**

Die Methode zur Isolierung boviner Nebennierenrindenzellen orientierte sich zum einen an der durch Petzinger und Seeger modifizierten Methode nach Berry und Friend [194, 195], zum anderen an den von Kilpatrick und Marley verwendeten Methoden zur Präparation von bovinen Nebennierenmarkzellen [196, 197] und erfolgte in Anlehnung an die am Institut etablierte Methode nach Neumann [198]. Grundbedingung für eine maximale Ausbeute an Nebennierenrindenzellen war die Verarbeitung des kompletten intakten Organs.

Die zu präparierenden bovinen Nebennieren wurden ca. zehn Minuten nach Eintritt des Todes dem Schlachttierkörper entnommen. Die Entnahme der Versuchsorgane wurde aus arbeitstechnischen Gründen durch das Schlachthofpersonal durchgeführt. Zu beachten war, dass die linke Nebenniere aufgrund ihrer gestreckten, unregelmäßigen Bohnenform [199] zur späteren Katheterisierung am besten geeignet war. Die Organkapsel musste bei der Entnahme unversehrt bleiben, ebenso ein ca. 2cm<sup>2</sup> großes Gewebestück der Vena cava caudalis [199]. Nach erfolgreicher Isolierung der Nebenniere wurde diese zügig von den umgebenden Fett- und Bindegewebsanteilen (s. Abb. 18) befreit. Die Nebenniere wurde nun ausgehend von der Vena cava caudalis durch die Vena centralis mit einem mehrfach perforierten (Abb. 19) Venenkatheter retrograd katheterisiert [199] (Abb. 15). Die Länge des Katheters entsprach der geschätzten Länge der Vena centralis und die multiple Perforation garantierte eine gleichmäßige Verteilung der Spül- und Perfusionslösungen im gesamten Organ. Mit Hilfe eines Fadens wurde der Katheter in dem als Kragen dienenden Gewebestück der Vena cava caudalis fixiert (Abb. 19). Nun erfolgte die retrograde Infiltration mit anschließendem Ablassen von jeweils ca. 10 ml eines eiskalten Ca<sup>2+</sup>-freien Krebs-Henseleit-Puffers. Hierdurch wurde ein Teil des Organblutes entfernt.

Da aufgrund der multiplen arteriellen Versorgung der Nebenniere mit kleinen Gefäßen (Abb. 15) keine orthograde Perfusion möglich ist, retrograd aber kein Durchfluss durch das komplette Organ zu erzielen war, bedeutete dieser Spülvorgang ein mehrmaliges Aufpumpen und anschließendes Ablassen der Nebenniere mit Puffer. Nach dem letzten Spülvorgang wurde die Nebenniere abschließend mit Puffer aufgepumpt, der Katheter verschlossen und das Organ in eiskalten Ca<sup>2+</sup>-freien Krebs-Henseleit-Puffer eingelegt. Ziel dieser ersten Spülvorgänge war neben der Entfernung von Blut auch die Vermeidung einer

gefäßverschließenden Koagulation. Auf Eis gekühlt, wurden so jeweils zwei Versuchsorgane zum Labor transportiert.



**Abb. 15: Blutversorgungssystem der Nebenniere, schematisch (nach Kristic 1984 [8])**

Dort wurden die Nebennieren schnellstmöglich weiterverarbeitet. Noch anhaftendes Fett- und Bindegewebe wurde entfernt, bevor die Kapsel mit einem Skalpell mehrfach perforiert und das Organ mit einem Liter auf 37°C erwärmten Krebs-Ringer-Puffer gespült wurde.

Diese multiplen Läsionen garantierten bei der darauffolgenden Perfusion einen kontinuierlichen retrograden Flüssigkeitsstrom ausgehend von der Vena centralis durch das Markgewebe und das Rindengewebe bis hin zum Austritt aus den gesetzten Läsionen in der Kapseloberfläche (Abb. 15, 20). Die Längsanordnung der Schnitte war für das Isolierungsverfahren optimal. Es war jedoch darauf zu achten, dass das Rindengewebe während der Perforation der Kapsel unverletzt blieb. Zu tiefe Einschnitte in die Rinde hätten der Spül- und auch der Kollagenase-Lösung einen zu schnellen Durchfluss erlaubt, wodurch die Zellausbeute gemindert und der Anteil an toten Zellen erhöht worden wäre.

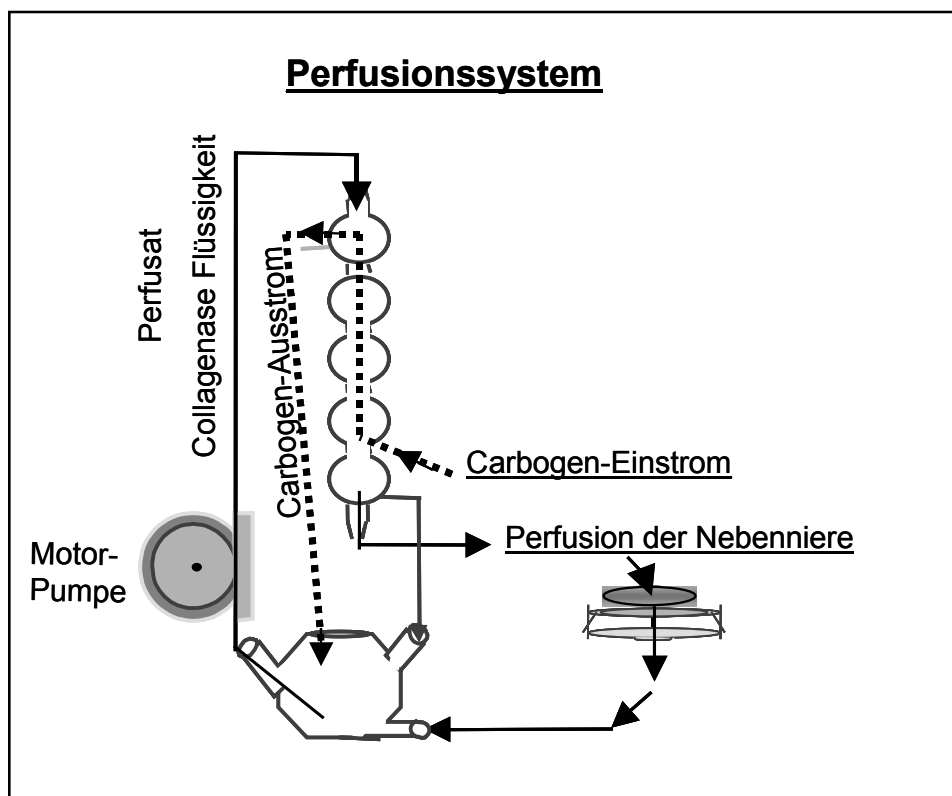
Da die Nebennieren während der Schlachtung meist sehr schlecht ausbluteten, war die erneute Organspülung im Labor zur weiteren Reduzierung der vorhandenen Blutmengen unbedingt notwendig; außerdem diente sie der Erwärmung des gekühlten Organs, um für die anschließende Kollagenase eine optimale Reaktionstemperatur von 37°C zu schaffen.



Die Geschwindigkeit der Spülung (Perfusionsrate) war optimal eingestellt, wenn zwei Nebennieren für den Zeitraum von mindestens 20 Minuten gemeinsam mit 1 Liter Krebs-Ringer-Puffer perfundiert wurden.

Im Anschluss daran wurden die Nebennieren in ein temperiertes Perfusionssystem (Schimassek, 1963) integriert (Abb. 16) und mit einer stetig rezirkulierenden 0,33-0,4%igen Kollagenase-Lösung perfundiert. Durch verschiedene enzymatische Aktivitäten der Kollagenase (enthält Aktivitäten von Kollagenase, Clostripain, Caseinase, Trypsin) wurden die interzellulären Verbindungen aufgelöst und dadurch der Zellverband gelockert [194]. Die Temperatur des Perfusates lag zwischen 37,0 und 37,5°C.

Die Tropfgeschwindigkeit des aus den Läsionen tropfenden Perfusates sollte ein Tropfen pro zwei bis drei Sekunden nicht überschreiten, um eine weitreichende Verteilung und eine ausreichende Einwirkzeit der Kollagenase im gesamten Organ zu erzielen. Um ein Austrocknen des Organs zu verhindern, sollte es während der Perfusion unter einer Glasabdeckung liegen. Die Perfusionszeit lag abhängig von der enzymatischen Aktivität der Charge der Kollagenase und der Größe der Organe zwischen 18 und 37 Minuten. Getestet wurde der Verdauungsgrad der Nebenniere durch Palpation des Organs. Ein gut verdautes Organ verfügte über eine weiche Konsistenz. Zusätzlich konnte man das Nebennierenrindengewebe durch die Kapsелеinschnitte hervorquellen sehen (Abb. 21).



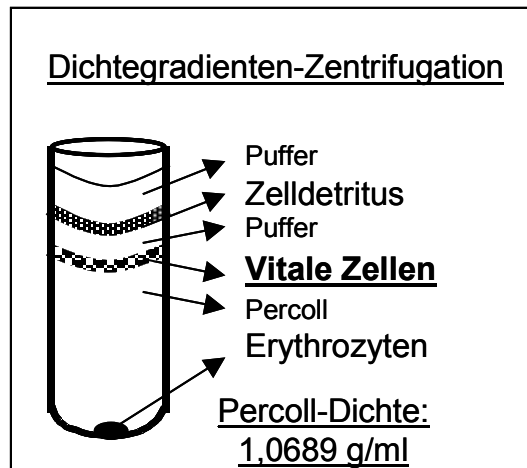
**Abb. 16: Modell des rezirkulierenden Perfusionssystems**

Die Nebenniere wurde nun aus dem Perfusionssystem entfernt und von ihrem Katheter befreit. Nach Längsspaltung des Organs war das weiche hellbraune Nebennierenmark leicht von der noch etwas festeren dunkelbraunen Rinde zu unterscheiden (Abb. 22).

Das Mark wurde mit einem Skalpell vorsichtig zur Seite geschoben und das Rindengewebe so vollständig wie möglich von der Kapsel geschabt. Ein Abschaben der Rinde in Längsrichtung zu den Kapselschnitten verhinderte ein Zerreißen der Kapsel. Das abgeschabte Rindengewebe wurde zusammen mit der zuvor rezirkulierten Kollagenase-Lösung in einen 250 ml Rundkolben überführt und unter ständigem Schwenken für 8 Minuten mit Carbogen begast. Damit erfolgte nun eine letzte und intensive Verdauung der noch bestehenden interzellulären Verbindungen.

Im Anschluss an die Carbogenbegasung wurde die erhaltene Zellsuspension zwecks Beseitigung noch verbliebener größerer Zellverbände sowie des restlichen Bindegewebes und Teilen der Kapsel durch eine doppelagige Mullgaze filtriert. Die Zellen lagen nun als Einzelzellsuspension vor, die im Folgenden zum Schutz vor weitergehendem Verdau von der enzymatischen Perfusionslösung getrennt wurde. Hierfür wurde die Zellsuspension zweimal bei 100 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgegossen und das Zellpellet mit Krebs-Ringer-Puffer resuspendiert. Da durch diese Waschschrte der Zelldetritus nur grob beseitigt werden konnte und im Zellpellet befindliche Erythrozyten nicht zu separieren waren, wurde als weiterer Reinigungsschritt eine Zentrifugation durch einen Percoll-Dichtegradienten durchgeführt. Das erhaltene Zellpellet wurde dazu in insgesamt 20 ml Krebs-Ringer-Puffer resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 5ml auf eine Säule von 20 ml Percoll vorsichtig aufgeschichtet. Die Dichte des Percoll war zuvor auf 1,0689 g/ml eingestellt worden (vgl. Kap. 4.3). Die sich anschließende Zentrifugation bei 800 x g für 20 Minuten erlaubte eine Auftrennung der Zellsuspension in Erythrozyten (Sediment), vitale NNRZ (im oberen Drittel der Säule zu finden) und Zelldebris (oberhalb der vitalen NNRZ) (Abb. 17, 23). Die intakte Zellfraktion wurde von der Percoll-Säule abpipettiert.

Um auf Dauer zytotoxisch wirkende Percollreste aus der aufgereinigten Zellsuspension zu entfernen, wurde diese auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und mit jeweils 30 ml Krebs-Ringer-Puffer versetzt. Die anschließende Zentrifugation bei 200 x g für 5 Minuten mit anschließender Resuspension wurde ein zweites Mal wiederholt. Die erhaltenen Zellpellets wurden in 15-20 ml Krebs-Ringer-Puffer resuspendiert und nach Filtration durch einen Einzelzellfilter (70 µm Maschenweite) bis zur Kultivierung bei 37°C mit Carbogen im Schüttelwasserbad aufbewahrt.



**Abb. 17: Bandenbildung nach Percoll-Dichtegradientenzentrifugation.**

Die Fraktion der vitalen Zellen wird aus der Bande der „Vitalen Zellen“ herauspipetiert.

Zur Überprüfung der Vitalität von isolierten bovinen NNRZ wurden diese zur Ermittlung der vorhandenen Zellzahl und des Anteils toter Zellen nach einer Färbung mit Trypanblau (Endkonzentration 0,4 %) in einem Hämozytometer nach Bürker-Türk ausgezählt [200].

Die Zellzahl wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$M = n \times \frac{V}{250} \times 4 \times 10^6$$

**M**= Zellzahl [Zellen/ml]

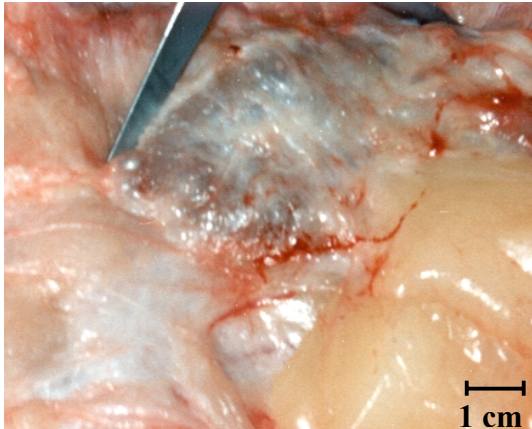
**V**= Verdünnungsfaktor 10

(50 µl Zellsuspension in 500 µl einer 0,4%igen Trypanblau- Lösung)

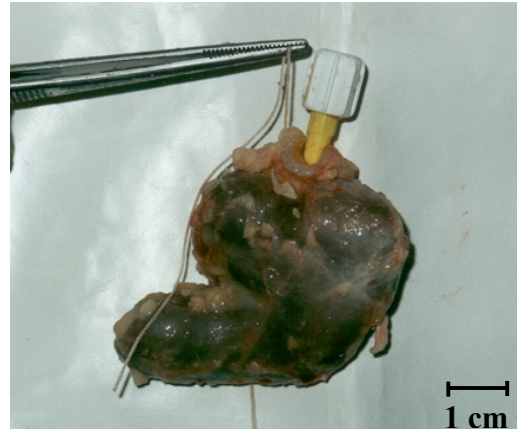
**n** = Zellzahl in 16 Großquadranten

## 4.2. Präparation von bovinen NNMZ

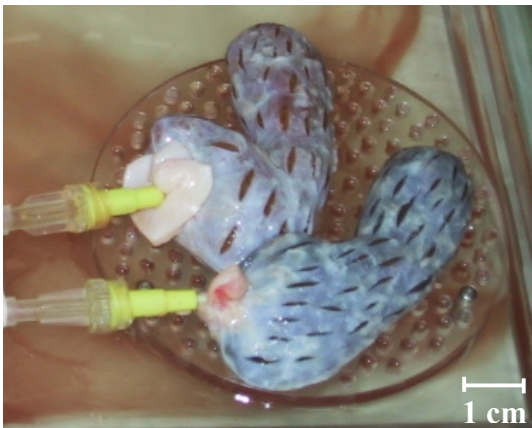
Für die präparative Gewinnung einer Zellsuspension aus bovinen Nebennierenmarkzellen wurde das gleiche Präparationsprotokoll verwendet wie für bovine Nebennierenrindenzellen (Kap. 4.1). Den einzigen Unterschied stellte die Dauer der rezirkulierenden Perfusion dar. Da die Markzellen aufgrund ihres direkten Kontaktes zur Vena centralis bzw. zu den Markvenen (Abb. 15) einer intensiveren enzymatischen Katalyse durch die Kollagenase ausgesetzt wurden, war die Zeit des Verdaus um ca. fünf Minuten zu verkürzen. Anschließend erfolgte die manuelle Aberntung der Nebennierenmarkzellen; Kapsel und Nebennierenrindenzellen wurden verworfen. In allen folgenden Schritten der Präparation bestanden keine Unterschiede zwischen den Isoliermethoden für Nebennierenrinden- und -markzellen.



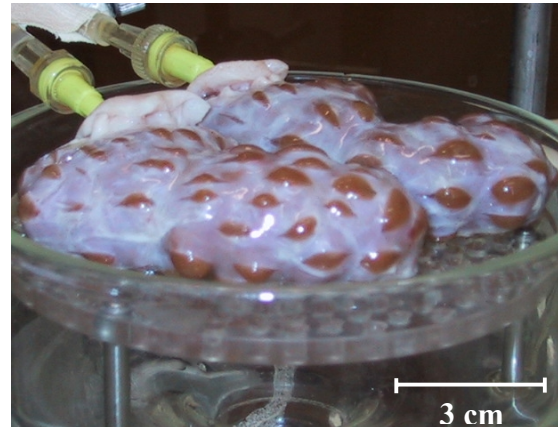
**Abb. 18:** Nebenniere in ihrer Fettkapsel.



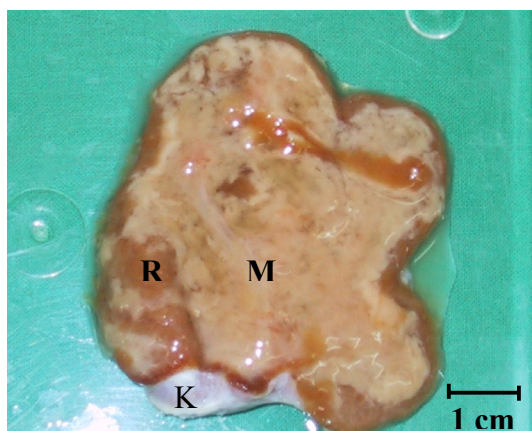
**Abb. 19:** Nebenniere nach grobem Entfernen von Fett- und Bindegewebe und retrograder Katheterisierung durch die Vena centralis.



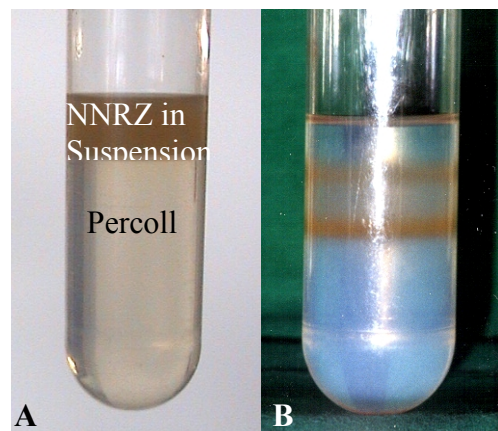
**Abb. 20:** Katheterisierte und mit multiplen Inzisionen versehene Nebennierenkapsel zweier Organe während des Spülvorgangs.



**Abb. 21:** Nebennieren während der Kollagenase-Einwirkung. Rindenanteile treten durch die Inzisionen der Kapsel hervor.



**Abb. 22:** Längs gespaltene Nebenniere nach gelungenem Kollagenaseverdau (M: Nebennierenmark; R: Nebennierenrinde; K: durch Um-kklappen sichtbarer Kapselanteil).



**Abb. 23:** NNRZ in Suspension vor (A) und nach (B) der Zentrifugation im Percoll-Dichtegradienten.

### 4.3. Erstellen des Percoll-Dichtegradienten

Die Dichte der Percoll-Lösung war so zu wählen, dass intakte Nebennierenrindenzellen direkt oben auf der Percoll-Säule aufgeschichtet wurden. Die Erythrozyten sollten aufgrund ihrer, gegenüber der Percoll-Dichte erhöhten Dichte von 1,09 g/ml [201] durch die Percoll-Säule hindurch wandern und am Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentieren. Noch vorhandene Zellfragmente waren aufgrund ihrer geringeren Dichte in der Pufferlösung oberhalb der Percoll-Säule zu finden.

Die Dichte der im Durchmesser 11-12 µm großen Zona glomerulosa Zellen beträgt 1,066-1,069 g/ml [202], während Zona fasciculata Zellen eine mit 1,040 g/ml geringere Dichte aufweisen [203]. Die Dichte des Percoll-Gradienten wurde auf 1,0689 g/ml festgelegt. Hierzu musste die von Sigma bezogene Percoll-Lösung (Hersteller: Amersham Pharmacia Biotech Ltd.), die eine Ausgangsdichte von  $1,13 \pm 0,005$  g/ml aufwies, verdünnt werden. In Anlehnung an das vom Hersteller publizierte Percoll-Handbuch (How to make and use gradients of Percoll In: Percoll®-Methodology and Applications (1995), Pharmacia Biotech, Inc., Molecular Biology Reagents Division, USA, Seiten 5-12), wurde im ersten Schritt eine isotonische Percoll-Stocklösung (9 Teile Percoll + 1 Teil 1,5 M NaCl) mit einer Dichte von 1,123 g/ml hergestellt. Im zweiten Schritt wurde diese isotonische Stocklösung mit 0,15 M NaCl zu einer endgültigen Arbeitslösung nach folgender Formel verdünnt:

$$V_y = V_i \frac{(P_i - P_l)}{(P - P_y)}$$

**$V_y$ :** Volumen des Verdünnungsmediums (0,15 M NaCl): 84 ml NaCl

**$V_i$ :** Volumen der isotonischen Percoll-Stocklösung: 100 ml

**$P_i$ :** Dichte der isotonischen Percoll-Stocklösung: 1,123 g/ml

**$P_l$ :** Dichte der Percoll-Arbeitslösung: 1,0689 g/ml

**$P$ :** Solldichte der Percoll-Arbeitslösung: 1,0689 g/ml

**$P_y$ :** Dichte des Verdünnungsmediums (0,15 M NaCl): 1,0046 g/ml

#### **4.4. Bestimmung des Proteingehaltes**

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Zellsuspension erfolgte nach der von Bradford entwickelten Methode [204]. Der hier verwendete Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 verändert sein Absorptionsmaximum nach der Bindung von Proteinen im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm. Die Extinktion wird bei 578 nm gemessen. Die bei dieser Wellenlänge bestimmte Extinktion nimmt mit steigendem Proteinwert gegenüber dem Leerwert linear zu und kann in Form einer mit Ovalbumin erstellten Eichgeraden für die Proteinwertbestimmung herangezogen werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie unabhängig von der Häufigkeit aromatischer Aminosäuren im Protein ist [205].

Als Vorbereitung zur Proteinwertbestimmung wurden 100 µl der aus den Freisetzungsversuchen stammenden Zellsuspension über Nacht bei -20 °C tiefgefroren. Nach Auftauen der Zellsuspension wurden 5 µl der nun thermisch lysierten Zellen mit 795 µl Aqua bidest und 200 µl Bio-Rad Reagenz vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Extinktion gegenüber dem Leerwert (800 µl Aqua bidest und 200 µl Bio-Rad Reagenz) photometrisch gemessen und auf ein Zellsuspensionsvolumen von 1 µl bezogen. Der Proteingehalt war anhand der erstellten Eichgeraden in mg/ml abzulesen.

#### **4.5. Bestimmung der Vitalität und endokrinologischen Aktivität von primären bovinen NNRZ**

##### **4.5.1. Durchflusszytometrie mit präparierten bovinen NNRZ**

Für die durchflußzytometrische Analyse wurde ein EPICS<sup>TM</sup> Elite Analyser (*Fa. Beckman-Coulte, Krefeld, Germany*), ausgerüstet mit einem 488 nm Argonlaser und einer Standardfilterkombination (488 nm Seitwärtsstreulicht, 525 nm für Fluoreszenz 1 (Fl.1), 575 nm für Fl. 2 und 630 nm für Fl. 3) verwendet. Die Einstellung der Geräteparameter erfolgte anhand von Vorversuchen, wurde in Form eines Standardprotokolls gespeichert und dann für alle weiteren Messungen verwendet. Die Aufarbeitung und statistische Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem für diesen Gerätetyp spezifischen Computerprogramm (Elite, Version 4.01).

Die Zellsuspension wurde auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml Krebs-Ringer Puffer eingestellt und bei 37°C unter Schütteln aufbewahrt. Zur Messung wurde eine Verdünnung von 150 µl Zellsuspension mit 450 µl Puffer vorgenommen. Je 100 µl dieser Zellsuspension wurden dem Messkanal zugeführt.

#### **4.5.2. Bestimmung des Gehaltes an LDH in der Zellsuspension**

Die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) kann vermehrt im Suspensionsmedium von Zellen nachgewiesen werden, deren Zellmembran aufgrund zytotoxischer Einflüsse, wie übermäßiger Einwirkung der Kollagenase im Rahmen der Zellpräparation oder Sauerstoffmangel, maximal geschädigt ist, so dass der Zelltod folgt. In diesem Falle ist ein stetig ansteigender Aktivitätsnachweis der LDH im extrazellulären Puffer ein eindeutiger Hinweis dafür, dass die in Suspension befindlichen Zellen an Vitalität verlieren.

Die mit der in Kapitel 4.1 beschriebenen Methode isolierten NNRZ wurden in einer Konzentration von  $8 \times 10^6$  Zellen/ml Zellsuspension über einen Zeitraum von 120 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad unter Carbogenbegasung aequilibriert. Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils 200 µl der Zellsuspension entnommen. Nach Abzentrifugieren der Zellen in der Tischzentrifuge 5417 C (Eppendorf) bei 10.000 g für 15 Sekunden wurde der Pufferüberstand zur LDH-Bestimmung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C tiefgefroren. Die endgültige Bestimmung der LDH-Aktivität wurde freundlicherweise von den Mitarbeitern des Zentrallabors des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie an den Universitätskliniken der Justus-Liebig Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. N. Katz durchgeführt. Die hierbei verwendete Methode macht sich die Überführung von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  bei der Umsetzung von Laktat zu Pyruvat zunutze. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional der LDH-Konzentration, die photometrisch im Roche/Hitachi Analyseautomaten 911 messbar war.

## **4.6. Kultivierung der primären bovinen Nebennierenrindenzellen, der primären bovinen Nebennierenmarkzellen und der PC12-Zelllinie**

### **4.6.1. Kultivierung der primären bovinen NNRZ**

Unmittelbar nach abgeschlossener Präparation wurden  $8 \times 10^6$  NNRZ in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer 25 cm<sup>2</sup> großen unbeschichteten Zellkulturflasche im Wärmeschrank bei 37°C und unter Carbogenbegasung mit 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Der Austausch des Mediums erfolgte nach spätestens 24 Stunden.

### **4.6.2. Kultivierung der primären bovinen NNMZ**

Zur stabilen Adhäsion an den Zellkulturflaschenboden benötigten die bovinen NNMZ eine Beschichtung mit Rattenschwanzkollagen, die am Tag vor der Inkulturnahme erfolgte. Hierzu wurden pro Zellkulturflasche 40 µl Kollagen mit 960 µl absolutem Ethanol gemischt und in eine 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben. Die Beschichtung war nach dem Abdampfen des Ethanols abgeschlossen.

### **4.6.3. Kultivierung der PC12-Zelllinie**

Die Zellen der PC12-Zelllinie benötigten ebenso wie die primären bovinen Nebennierenmarkzellen eine Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Rattenschwanzkollagen. Die Beschichtung erfolgte am Vortag vor der Inkulturnahme der PC12-Zellen wie unter Kap. 4.6.2. beschrieben. Die als Kryostep in flüssigem Stickstoff gelagerten PC12-Zellen tauten 2-3 Minuten im Wasserbad bei 37°C auf; der Inhalt eines Röhrchens wurde in 9 ml vorgewärmtes (37°C) Medium (Medium für PC12-Zellen) hinein pipettiert und bei 500 x g 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und in einer 80 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung. Im Folgenden wurde das Medium bis zum Beginn des Versuchs zunächst nach 24 Stunden ausgetauscht, ab dem zweiten Tag nach 48 Stunden.

Sobald sich die Zellen zu einem unter dem Lichtmikroskop sichtbaren konfluierenden Monolayer vermehrt hatten, konnte mit dem Stimulations- bzw. Inhibitionsversuch begonnen



werden. Sie wurden nach dem gleichen Schema wie bei den bovinen NNRZ (Kap. 4.7. und Kap. 4.8.) durchgeführt.

#### **4.7. Messung des Ouabain- und Cortisolgehaltes sowohl im Zellüberstand als auch intrazellulär an bovinen NNRZ in Suspension**

Das im Rahmen der Stimulationsversuche suspendierter und kultivierter NNRZ verwendete ACTH stammt von der Tierart Schwein und stellte nach einem Homologievergleich auf Aminosäure-Ebene mittels BLASTP 2.0.6 aller über NCBI zu erreichenden Datenbanken die beste Alternative zu dem nicht käuflich zu erwerbenden ACTH der Tierart Rind dar.

Die suspendierten NNRZ wurden direkt nach abgeschlossener Präparation auf eine Zellkonzentration von  $8 \times 10^6$  NNRZ/6ml Krebs-Ringer-Puffer pro Versuchsansatz eingestellt. Konstante Bedingungen wurden durch ein auf 37°C temperiertes Schüttelwasserbad und gleichmäßige Carbogenbegasung aufrechterhalten.

Zum Zeitpunkt  $T_0$  (ca. 20 Minuten nach Abschluss der Präparation) wurde den positiven Versuchsreihen ACTH [Endkonzentration 1µM] bzw. die Kombination aus ACTH und jeweils Antimycin [Endkonzentration 37,5 µM], Oligomycin [Endkonzentration 25,8 µM/258 µM/129 µM], Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) [10 µM], Forskolin [20 µM] oder Cyclosporin A [100 nM] appliziert.

Die Zellen des Kontrollansatzes erhielten abhängig von der jeweiligen Kombination der zugesetzten Testsubstanzen in den anderen Ansätzen äquivalente Volumina an Lösungsmittel. Beim Zusatz von ACTH sowohl mit Oligomycin, Antimycin A und mit Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon (CCCP) als auch mit Cyclosporin A (CSA) war zu beachten, dass die ACTH-Zugabe frühestens fünf Minuten nach Zugabe der aufgezählten, potentiell inhibierend auf die Cortisolfreisetzung wirkenden Substanzen erfolgte.

Zu definierten Zeitpunkten (0, 30, 60, 90, und 120 Minuten) wurden jeweils 800 µl Zellsuspension entnommen. Von diesem Aliquot wurden 50 µl zur späteren Bestimmung des Proteinwertes bei -20°C separat tiefgefroren. Die übrigen 750 µl wurden in der Eppendorf-Zentrifuge 5415 mit einem Festwinkelrotor (18 x 3,5g) bei 10.000 U/min für 8 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -20°C tiefgefroren. Das Zellpellet

wurde für die spätere Bestimmung des intrazellulären Cortisolgehaltes in 750 µl Krebs-Ringer-Puffer resuspendiert und ebenfalls bei –20°C tiefgefroren.

Die Cortisol-Bestimmung der Proben führte freundlicherweise das Zentrallabor des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie an den Universitätskliniken der Justus-Liebig Universität Gießen mittels Anwendung eines kompetitiven Immunoassays (Automated Chemoluminescence System (ACS): 180 Cortisol assay, Bayer Corporation, Tarrytown, NY USA) durch.

#### **4.8. Messung sowohl der Freisetzung als auch der intrazellulären Gehalte von Ouabain- und Cortisol in Primärzellkulturen boviner NNRZ, NNMZ und Zellen der PC12-Zelllinie**

##### **4.8.1. Messung des Ouabain- und Cortisolgehaltes sowohl im Zellüberstand als auch intrazellulär in Primärzellkulturen boviner NNRZ**

Hierfür wurden am Präparationstag  $8 \times 10^6$  NNRZ in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer 25 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C unter einer Carbogenbegasung mit 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach mindestens 16 Stunden hatten die Zellen einen am Kulturgefäßboden anhaftenden Zell-Monolayer gebildet, sodass das Zellkulturmedium ohne Zellverlust vollständig erneuert werden konnte.

Den Zellpopulationen wurde jeweils als vierfacher Ansatz eine Einzelsubstanz oder aber eine Kombination der folgenden Substanzen zugesetzt: ACTH [Endkonzentration 1 µM], Angiotensin II [100nM], Pregnenolon [5; 50; 500 nM; 1; 5; 20; 50; 100 µM], Progesteron [5; 50; 500 nM; 1; 5; 20; 50; 100 µM], Valeriansäure [100 µM], Malonyl-Coenzym A [50 µM], Malonsäure [100 µM], Propionsäure [100 µM], Antimycin A [37,5 µM], Oligomycin [25,8 µM], Phenylephrin [1; 10; 100 µM], α-Ketoglutarat [100 µM], CCCP [10 µM], Forskolin [100 µM], Metyrapon [100µM], Digitoxigenin [1µM], Corticosteron [1µM] und Aldosteron [1µM].

Die Versuchsdauer erstreckte sich dann entweder über insgesamt 8 Stunden, mit zwei vierstündigen Inkubationsphasen, über 12 Stunden mit drei vierstündigen Inkubationsphasen, über 24 Stunden mit sechs vierstündigen Inkubationsphasen, über 48 Stunden mit sechs vierstündigen oder über 72 Stunden mit Messungen nach 4, 8, 12, 16, 24, 48 und 72 Stunden. Zu jedem Messzeitpunkt wurden 800 µl des Zellüberstandes für die Cortisolbestimmung entnommen und bei -20°C tiefgefroren. Die übrigen 4,2 ml Zellüberstand wurden bis zur weiteren Aufarbeitung zwecks späterer Bestimmung des Ouabaingehaltes ebenfalls bei -20°C tiefgefroren.

Zu jedem Messzeitpunkt erfolgte ein vollständiger Austausch des Zellüberstandes durch frisches Medium und der Zusatz der ursprünglichen Substanzkombination in jeweils gleicher Menge.

Zum letzten Messzeitpunkt wurde nach Entnahme des Zellüberstandes statt Medium ein PBS-Puffer für die spätere intrazelluläre Cortisol- und Ouabainbestimmung und die Messung des Proteingehaltes in gleichem Volumen (5 ml) zugesetzt. Die Kulturflaschen wurden daraufhin bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C separat tiefgefroren.

#### **4.8.2. Messung des Ouabain- und Cortisolgehaltes sowohl im Zellüberstand als auch intrazellulär an Primärzellkulturen boviner NNMZ**

Die bovinen Nebennierenmarkzellen wurden mit  $8 \times 10^6$  NNMZ in 8 ml Kulturmedium in 80 cm<sup>2</sup> großen, mit Kollagen-beschichteten Zellkulturflaschen in Kultur genommen. Es konnte 16-18 Stunden nach der Präparation mit einem Versuch begonnen werden. Hierzu wurde, wie auch zu jedem späteren Messzeitpunkt, das verbrauchte Medium vollständig durch frisches ersetzt. Je vier Kulturflaschen pro Ansatz wurde ACTH [Endkonzentration 1 µM], Phenylephrin [Endkonzentration 10 nM, 1 µM, 10 µM] oder eine Kombination aus beiden Substanzen zugesetzt. Die Kontroll-Zellpopulation erhielt jeweils äquivalente Volumina an PBS-Puffer, da dieser beiden zugesetzten Substanzen als Lösungsmittel diente. Nach vierstündiger bzw. achtstündiger Inkubationszeit wurde der gesamte Zellüberstand für die Ouabainbestimmung abgenommen und, abgesehen vom letzten Messzeitpunkt, durch frisches Medium und zugegebenes ACTH bzw. Phenylephrin ersetzt. Zum letzten Messzeitpunkt jedoch erfolgte ein Zusatz von 8 ml PBS-Puffer mit anschließendem Tieffrieren der Zellkulturflaschen bis zum späteren Aufarbeiten der Proben bei -20°C.

### **4.8.3. Messung des Ouabain- und Cortisolgehaltes sowohl im Zellüberstand als auch intrazellulär an Zellen der PC12-Zelllinie**

Für die PC12-Zelllinie mussten 14 Tage Zeitaufwand angesetzt werden, gerechnet vom Auftauen der Kryosteps bis hin zur Bildung eines konfluierenden Zellmonolayers bevor mit einem Stimulationsversuch begonnen werden konnte. Dem Medium der Zellen wurde zwecks Untersuchung ihrer funktionellen Vergleichbarkeit mit bovinen primären NNMZ Phenylphrin [Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$ ] zugesetzt. Die Probennahme erfolgte in Zeitabständen von jeweils 4 Stunden. Dazu wurde der Zellüberstand vollständig entfernt und bis zur Aufbereitung für die später folgende Ouabainbestimmung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Zu jedem Messzeitpunkt wurde das Medium vollständig gegen frisches ausgetauscht und gemäß der Versuchsansätze mit Phenylephrin bzw. ACTH [1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration] versehen. Zum letzten Messzeitpunkt jedoch erfolgte ein Zusatz von 8 ml PBS-Puffer mit anschließendem Tieffrieren der Zellkulturflaschen bis zum späteren Aufarbeiten der Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **4.9. Probenaufbereitung**

### **4.9.1. Vorbereitung der Zellkulturflaschen zur Bestimmung der intrazellulären Ouabain- und Cortisolkonzentration sowie der Proteinkonzentration**

Die tiefgefrorenen Zellkulturflaschen wurden am Folgetag nach Versuchsende aufgetaut und der Zelldetritus der lysierten Zellen mechanisch vollständig vom Flaschenboden abgelöst. Von diesem Gemisch aus PBS-Puffer und Zelllysate wurden 50  $\mu\text{l}$  zur Proteinbestimmung entnommen. Das übrige Gemisch wurde für fünf Minuten in einem Ultraschallbad beschallt, um die rein thermische Lysierung des Tieffrierens zu ergänzen. Anschließend wurden die Lysate bei 600 x g (*Tischzentrifuge Universal 2S, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen*) zentrifugiert. 800  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden zur Cortisolbestimmung verwendet; das restliche Volumen wurde der Eluierung zwecks Ouabainnachweis zugeführt.

#### **4.9.2. Eluierung des Ouabains aus dem Zellüberstand sowie aus dem Zelllysat**

Die an den Stimulationsversuch angeschlossene Aufbereitung der Proben sah vor, das im Zellkulturmedium gelöste Ouabain zu extrahieren. Dies geschah unter Verwendung von C-18 Säulen (500 mg; 10 ml, XL), an deren C-18 Reste das zu extrahierende Substrat durch seinen Steroidanteil bindet. Im Anschluss an einen zwischengeschalteten Waschschrift wird durch Zugabe hydrophober Lösungsmittel ein Ablösen des gebundenen Ouabains erreicht [206]. Durch die Verwendung des Supelco Model 5-7030 Vacuum Manifold konnten über 12 Säulen 12 Proben parallel nach folgendem Schema gereinigt werden:

1. Die C-18 Säulen wurden mit 5 ml einer Acetonitril-Lösung (100% Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure-Lösung (TFA)) gefolgt von 10 ml 0,1 %-iger Trifluoressigsäure-Lösung vorab aequilibriert. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde durch Anlegen eines Vakuums von 20 mm Hg über den gesamten Eluierungsvorgang hinweg konstant gehalten.
2. Im Anschluss an diese Phase durchlief die Probe das Säulenmaterial. In diesem Stadium erfolgte die Bindung des zu extrahierenden Substrates (Ouabain und andere Steroide) an das Säulenmaterial. Wichtig war hierbei, dass die Oberfläche der Säule stets mit einem Flüssigkeitsfilm überzogen blieb. Ein Austrocknen der Säulenoberfläche würde eine Unterbrechung im Extraktionsvorgang bedeuten, wodurch die Rückgewinnungsrate des Substrates ungleichmäßig und somit die Probe für die Interpretation des Versuches unbrauchbar wäre.
3. Nach dem sich anschließenden Reinigungsschritt mit 10 ml einer 0,1 % igen Trifluoressigsäure-Lösung erfolgte der eigentliche Elutionsschritt durch Auftragen von 3 ml einer Acetonitril-Lösung (25% Acetonitril/0,1% TFA) auf jede Säule. Dadurch wurde die Säule ausgewaschen und man fing das gebundene Material als Eluat auf.

Das nun in dieser Acetonitril-Lösung gereinigte Ouabain wurde für 20-24 Stunden in der Speedvac unter Vakuum-Bedingungen einrotiert und im getrockneten Zustand bis zur Analyse mittels ELISA bei – 20°C aufbewahrt.

## **5. Detektion des eluierten Ouabains mittels ELISA-Verfahren**

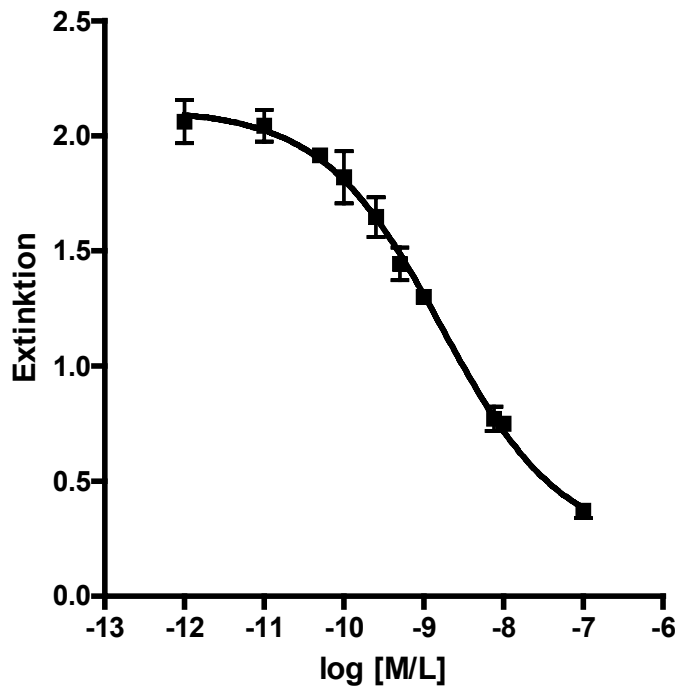
### **5.1. Prinzip des verwendeten ELISA-Verfahrens**

Das zur Analyse der Ouabain-Konzentrationen verwendete ELISA-Verfahren ist ein indirektes, kompetitives Verfahren, welches sich an der von Sich [207] etablierten Methode orientiert. Das an den Mikrotiterplattenboden gebundene proteingekoppelte Antigen (Trypsin gekoppeltes Ouabain) konkurrierte mit dem in der zu analysierenden Probe vorhandenen Ouabain um die Bindung an den primären Antikörper. Probe und erster Antikörper wurden nach Blockade der unspezifischen Bindungsstellen gemeinsam auf dem proteingekoppelten Ouabain-Antigen inkubiert.

Nach Entfernen der sich in Lösung befindlichen Antigen-Antikörper-Komplexe (Ouabain aus der Probe gebunden an den ersten Antikörper), wurden die am Mikrotiterplattenboden noch vorhandenen Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe des sekundären biotinylierten Antikörpers markiert. Eine Streptavidin-gekoppelte Phosphatase wurde anschließend an den biotinylierten sekundären Antikörper gebunden. Nach einer enzymatischen Reaktion, katalysiert durch die Streptavidin-gekoppelte Phosphatase, entstand durch Spaltung das photometrisch gut messbare Substrat p-Nitrophenylphosphat. Dessen Extinktion wurde bei 405 nm photometrisch bestimmt.

Je weniger Ouabain in der Probe enthalten war, um so höher war die gemessene Extinktion, da sich eine entsprechend höhere Zahl an Antigen-(proteingekoppelt)-Antikörper-Komplexen gebildet hatte.

Gemäß dieses Bezuges wurde eine Standardreihe mit verschiedenen Ouabainkonzentrationen erstellt, durch die zu jeder gemessenen Extinktion einer Probe eine definierte Ouabainkonzentration zugeordnet werden konnte (Abb. 24).



**Abb. 24: Standardkurve des ELISA im Bereich von  $10^{-7}$  M bis  $10^{-12}$  M Ouabain.** Jeder gemessenen Extinktion kann dadurch die Ouabain-Konzentration zugeordnet werden, die in einer Probe (Zellüberstand oder Zelllysate) enthalten gewesen ist.

## 5.2. Arbeitsschritte des verwendeten ELISA-Verfahrens

Am Vortag der eigentlichen Durchführung des ELISA-Protokolls (Tab. 10) wurden die Mikrotiterplatten mit dem proteingekoppelten Antigen (Ouabain-C6-Trypsin) beschichtet (Tab. 9).

Falls vorrätig beschichtete Mikrotiterplatten gelagert wurden, so geschah dies bei 4°C, nachdem sie zuvor luftdicht eingeschweißt worden waren.

Zu Beginn des ELISA-Protokolls am Folgetag wurden die einrotierten und tiefgefrorenen Proben in 700 µl TBS-Puffer gelöst. Aus dem Verhältnis dieses Volumens zum eluierten Volumen des Zellüberstandes ergab sich der Faktor der Konzentrierung.

**Tab.9: Protokoll zur Beschichtung der Mikrotiterplatte am Vortag**

Arbeitsschritt	Volumen pro Well (µl)	Reaktionszeit und Reaktions-temperatur
Alkalisieren der Mikrotiterplatte mit Beschichtungspuffer (pH 9,6)	100	15-30 Min.; RT
Entfernen des Beschichtungspuffers durch Ausklopfen der Platte		
Beschichten der Mikrotiterplatte mit Ouabain-C6-Trypsin in der Konzentration: 10mg/100ml	100 (=0,1 µg/Well)	über Nacht bei 37°C

**Tab. 10: Arbeitsschritte zur Durchführung des ELISA-Verfahrens am Folgetag**

Arbeitsschritt	Volumen pro Well (µl)	Reaktionszeit und Reaktions-temperatur
Blockieren der freien Bindungsstellen mit TBS-Gelatine Puffer	200	30 Min; RT
Waschen mit eiskaltem TBS-Tween Puffer	200	3 x 3 Min; RT
Auftragen der <u>Ouabain-Standard-Verdünnungsreihe</u>	100	
Auftragen der <u>Proben</u> (das Gesamtvolumen/Well muss 100 µl betragen)	(50/100) ad 100	
Zugabe des <u>primären Antikörpers</u> (Sheep-Anti-Ouabain-IgG) in einer Verdünnung von 1:1Mio.	10	60 Min; RT unter ständigem Schütteln (Titramax 100 <sup>®</sup> , Heidolph)



Waschen mit eiskaltem TBS-Tween Puffer	200	3 x 3 min; RT
Auftragen des sekundären biotinylierten Dunkey-Anti-Sheep Antikörpers in einer Verdünnung von 1:5000	100	60 min; RT unter ständigem Schütteln
Waschen mit TBS-Tween Puffer	200	3 x 3 min; RT
Zugabe des Konjugates Streptavidin-Alkalische Phosphatase in einer Verdünnung von 1:500	100	30 min; RT
Waschen mit TBS-Tween Puffer	200	3 x 3 min; RT
Zugabe der Substratlösung (1 mg/ml p- Nitrophenylphosphat angesetzt in Substratlösung)	100	30 min; RT unter ständigem Schütteln
Abstoppen der Reaktion mit 3 N NaOH nach ca. 12 Minuten Reaktionszeit	50	
Messung der Extinktion bei 405 nm		

### 5.3. Pipettierschema zur Analyse unbekannter Konzentrationen an Ouabain

**Tab. 11: Pipettierschema der Mikrotiterplatte zur Analyse des Ouabaingehaltes in unbekannten Proben**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TBS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
<b>B</b>	TBS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
<b>C</b>	TBS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
<b>D</b>	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl
<b>E</b>	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl
<b>F</b>	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl
<b>G</b>	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl
<b>H</b>	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl	100µl	50 µl		leer	Blank	Blank

Die Reihen A-C wurden mit Ouabainkonzentrationen der Standardreihe belegt, die sich über den Konzentrationsbereich von  $1 \times 10^{-7}$  bis  $1 \times 10^{-12}$  Mol/l Ouabain erstreckten (Tab. 12):

**Tab. 12: Ouabainkonzentrationen der Standardreihe gelöst in TBS-Puffer, nicht eluiert und einrotiert**

<b>I:</b>	$1 \times 10^{-12}$ Mol/l Ouabain	<b>VII</b>	$1 \times 10^{-9}$ Mol/l Ouabain
<b>II:</b>	$1 \times 10^{-11}$ Mol/l Ouabain	<b>VIII</b>	$7,5 \times 10^{-9}$ Mol/l Ouabain
<b>III:</b>	$5 \times 10^{-11}$ Mol/l Ouabain	<b>IX</b>	$1 \times 10^{-8}$ Mol/l Ouabain
<b>IV</b>	$1 \times 10^{-10}$ Mol/l Ouabain	<b>X</b>	$2,5 \times 10^{-8}$ Mol/l Ouabain
<b>V:</b>	$2,5 \times 10^{-10}$ Mol/l Ouabain	<b>XI</b>	$1 \times 10^{-7}$ Mol/l Ouabain
<b>VI:</b>	$5 \times 10^{-10}$ Mol/l Ouabain		

Die Reihen D-H wurden zur Detektion unbekannter Ouabainkonzentrationen verwendet. Jede Probe wurde zweimal mit 100 µl/Well aufgetragen und zweimal mit 50 µl/Well, wobei das

Volumen im letztgenannten Fall mit 50  $\mu$ l TBS-Puffer aufgefüllt wurde. Durch diese Verdünnung der Probe [1Teil Probe (50  $\mu$ l) und 1 Teil TBS-Puffer (50  $\mu$ l)] wurde zusätzlich eine interne Konzentrationsabhängigkeit des Nachweisverfahrens innerhalb einer Probe getestet und somit eine zusätzliche Kontrolle eingebaut.

Die Wells H11 und H12 wurden zur Kontrolle des gesamten ELISA-Verfahrens auf dieser Mikrotiterplatte verwendet: Durch das Fehlen des primären Antikörpers sollte hier keine spätere Enzymreaktion zu sehen sein. Die hier gemessenen Extinktionen wurden als sogenannte „Leer-Werte“ gleich Null gesetzt. Alle übrigen gemessenen Extinktionen wurden demzufolge als Differenz zu diesen Leer-Werten definiert.

#### **5.4. Kontrolle der verwendeten Reinigungsmethode zur Ouabaindetektion**

Zur Kontrolle der hier verwendeten Reinigungsmethode wurde eine Ouabain-Standardreihe in Aqua bidest in einem Konzentrationsbereich von  $1 \times 10^{-7}$  bis  $1 \times 10^{-10}$  Mol/l angesetzt und ohne Reinigung über die C-18 Säulen sofort einrotiert. Hierdurch war es möglich für alle Verdünnungsschritte auf das gleiche Ausgangssubstrat zurückzugreifen. Zur Durchführung des ELISA-Verfahrens wurden diese Proben mit dem Ausgangsvolumen an TBS-Puffer hochgelöst, so dass die vor dem Einrotieren vorhandenen Konzentrationen wieder erreicht wurden.

Verglichen wurde die nun in TBS-Puffer mit der parallel die im Zellkulturmedium hergestellte Standardreihe, die im Anschluss an eine Reinigung über C-18 Säulen einrotiert wurden.

Zusätzlich wurde am Tag der ELISA Durchführung eine Ouabain-Standardreihe in TBS-Puffer hergestellt und direkt für das ELISA-Verfahren verwendet, wodurch nun ein direkter Vergleich zu ziehen war, zum einen zwischen der Standardreihe in TBS und Medium (beides über C-18 Säulen gereinigt) und zum anderen zwischen der über C-18 Säulen gereinigten Standardreihe in TBS und der nicht gereinigten. Für alle Standardreihen wurde die gleiche Ouabainabwiegun verwendet.

**Tab. 13: Pipettierschema zur Kontrolle der verwendeten Reinigungsmethode**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$
B	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$
C	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$
D	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$	leer	leer	leer	leer	leer	leer
E	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$	leer	leer	leer	leer	leer	leer
F	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-8}$	$5 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$	$5 \times 10^{-10}$	leer	leer	leer	leer	leer	leer
G	Leer	leer	leer	Leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer
H	Leer	leer	leer	Leer	leer	leer	leer	leer	leer	leer	<b>Blank</b>	<b>Blank</b>

**Belegplan der Mikrotiterplatte:**

<b>A-C/1-6:</b>	Ouabain-Standardreihe in TBS-Puffer angesetzt und ohne Aufreinigung über C-18 Säulen
<b>A-C/7-12:</b>	Ouabain-Standardreihe in TBS-Puffer angesetzt und nach Aufreinigung über 6 C-18 Säulen einrotiert
<b>D-F/1-6:</b>	Ouabain-Standardreihe in Zellkulturmedium angesetzt und nach Aufreinigung über 6 C-18 Säulen einrotiert

## 6. Statistische Auswertungsverfahren

Die Datenauswertung der Cortisolgehalte und ebenso die Umrechnung der gemessenen Extinktionen in die zugehörigen Ouabainkonzentrationen anhand der erstellten Standardreihe wurden sowohl durch das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel<sup>®</sup> 2000 als auch durch Nutzung der PRISM<sup>™</sup> Software der GraphPad-Software, San Diego, CA 92121, USA software ([www.graphpad.com/](http://www.graphpad.com/)) ausgeführt. Standardabweichungen und Signifikanzen wurden auf der Grundlage der gleichen Kalkulationsprogramme berechnet.

## 6.1. Kurvenanpassung und Bestimmung der halbmaximalen Sättigung der Steroidsynthese bzw. -freisetzung aus Vorläuferverbindungen

Die Geschwindigkeit der Ouabain-Freisetzung [ $\text{pmol/mg Protein} \times 4 \text{ Std.}^{-1}$ ] bzw. Cortisol-Freisetzung [ $\mu\text{mol/mg Protein} \times 4 \text{ Std.}^{-1}$ ] kann als Funktion der Konzentration von Vorläufer-Substraten (Pregnenolon bzw. Progesteron, vgl. Kap. 7.8) untersucht werden. An die erhaltenen Messpunkte wurde eine Variation der Michaelis-Menten-Beziehung angepasst. Dabei wurde die aus endogenen Substraten stammende basale Steroidsynthese durch Kurvenanpassung ermittelt und abgezogen (Gleichung 1):

$$\text{Geschwindigkeit der Produktfreisetzung } v = \text{Basissekretion} + [V_{\max} * X / [K_M + X]]$$

In dieser Gleichung bedeuten

X = Dosis der Vorläufer-Verbindung in [ $\mu\text{M}$ ]

v = Geschwindigkeit der Steroid-Freisetzung (Ouabain bzw. Cortisol) in Abhängigkeit von der Konzentration des Vorläufer-Metaboliten [ $\mu\text{mol Dosis der Vorläufer-Metaboliten}$ ] in [ $\mu\text{mol Cortisol/mg Protein} \times 4 \text{ Std.}^{-1}$ ] bzw. [ $\text{pmol Ouabain/mg Protein} \times 4 \text{ Std.}^{-1}$ ]

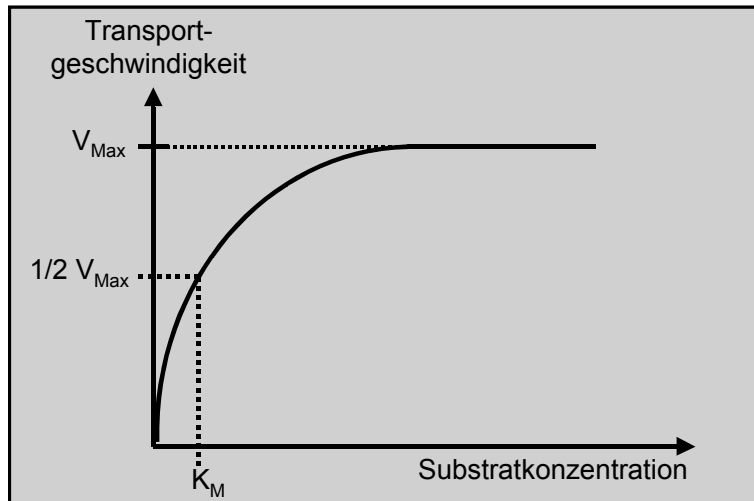
Basissekretion = Steroid-Freisetzung (Cortisol bzw. Ouabain) aus endogenen Vorläufermolekülen, die von allen weiteren Werten abgezogen wird

V = Geschwindigkeit der Steroid-Freisetzung in den Zellüberstand

$V_{\max}$  = maximale Geschwindigkeit der Steroid-Freisetzung in Abhängigkeit von der Dosis der Vorläufer-Stufe; die Berechnung erfolgt mit Gleichung 2 (s.u.)

$K_M$  = Halbmaximale Sättigungskonzentration der Steroid-Biosynthesekette

Hat man für einen Substrat-Transport eine Sättigungshyperbel erstellt (Abb. 25), dann wird die Transportgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration [X] ermittelt und daraus die maximale Geschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) sowie die halbmaximale Sättigungskonzentration ( $K_M$ ) der Steroidfreisetzung mit Gleichung 2 (s.u.) berechnet.



**Abb. 25: Michaelis-Menten-Kinetik des Substrat-Transportes als Modell für die Berechnung einer Kurvenanpassung**

Sättigungsfunktion eines Transporter-Systems auf der Grundlage einer Michaelis-Menten-Kinetik für Bindungsstudien (Gleichung 2):

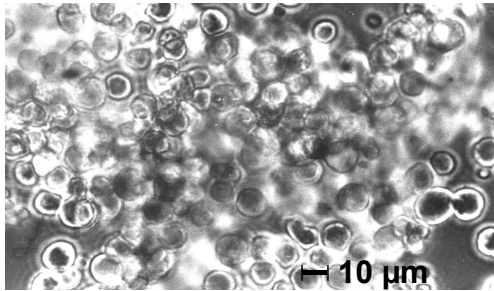
$$v = \frac{V_{\text{max}} * [X]}{K_M + [X]}$$

Alle Berechnungen erfolgten durch die GraphPad-Software.

## 7. Ergebnisse

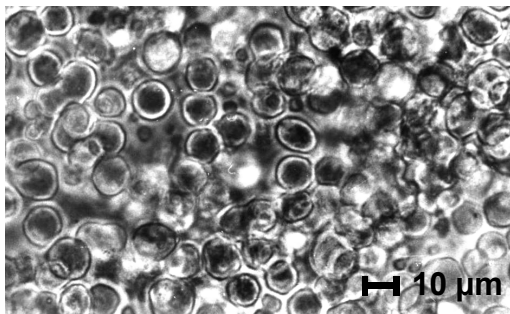
### 7.1. Morphologie isolierter boviner NNRZ und NNMZ

#### 7.1.1. Lichtmikroskopische Darstellung von bovinen NNRZ in Suspension



**Abb. 26:**  
NNRZ als Einzelzellen in Suspension,  
6 Std. nach der Präparation

Mit Hilfe der in Kapitel 4.1 beschriebenen Methode wurden aus zwei Organen durchschnittlich  $6 \times 10^8$  lebende Zellen isoliert ( $n=75$ ); der Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl betrug durchschnittlich 3% ( $n=75$ ). Am Durchflusszytometer zeigten die Zellen über einen Zeitraum von mindestens 6 Stunden hinweg keine Veränderung ihrer Fliesseigenschaften und kennzeichneten damit eine intakte Morphologie und stabile Vitalität.



**Abb. 27:**  
NNRZ in Kultur 26 Std. nach der  
Präparation. ( $8 \times 10^6$  Zellen in 5 ml  
Medium)

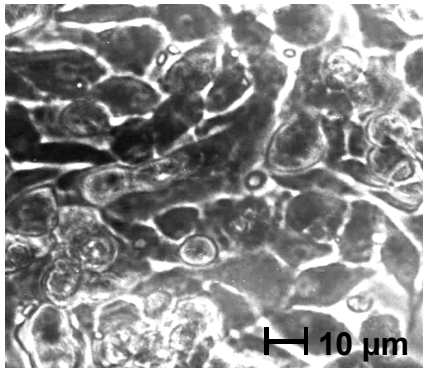
#### 7.1.2 Lichtmikroskopische Darstellung von bovinen NNRZ in Kultur

Direkt im Anschluss an die Präparation wurden  $8 \times 10^6$  lebende Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Grundfläche gebracht. Bovine Nebennierenrindenzellen benötigten eine 16-stündige Inkubationszeit bis zur stabilen Anheftung an den Kulturflaschenboden, d.h., dass nach diesem Zeitraum Flüssigkeitsströme, die durch den Wechsel des Mediums entstanden, ohne Ablösen der Zellen toleriert wurden.

Eine Beschichtung der Kulturflasche mit FKS oder mit Kollagen brachte bei Nebennierenrindenzellen von Rindern keinerlei Vorteile; der Zusatz von FKS zum Zellkulturmedium führte allerdings zu einer wesentlich stabileren Anheftung der Zellen an den Kulturflaschenboden.

Typisch für Nebennierenrindenzellen, die sich bereits in Kultur befinden, ist die polygonale Form mit runden Zellkernen. Ebenso typisch für Nebennierenrindenzellen sind dunkle Granula [208] (Abb. 27). Bovine Nebennierenrindenzellen sind direkt nach der Isolation 12,5 µm x 13,5 µm groß.

### 7.1.3 Lichtmikroskopische Darstellung von bovinen NNMZ in Suspension



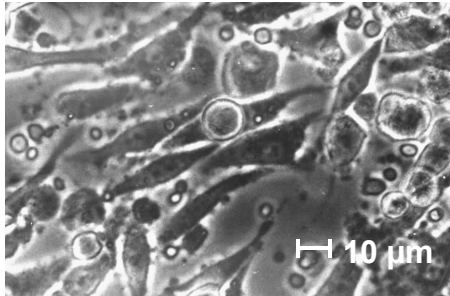
**Abb. 28:**  
**NNMZ in Suspension,**  
**6 Std. nach der Präparation**

Die zur Präparation von bovinen Nebennierenrindenzellen verwendete Methode wurde (vgl. Kapitel 4) an der Stelle der mechanischen Trennung der Nebennierenmarkzellen von den Nebennierenrindenzellen sowie durch eine Verkürzung der Verdauzeit modifiziert. Nicht die Markzellen, sondern die Rindenzellen wurden verworfen. Die Verdauzeit wurde um ca. 3-5 Minuten verkürzt. Ähnlich wie Kilpatrick et al., 1980 [196], mit einer Zellausbeute von  $5 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen pro Organ bei 95%-iger Vitalität wurden bei der vorliegenden Methode  $15-17 \times 10^7$  Zellen aus 2 Organen isoliert mit einem Anteil von durchschnittlich 5,5% toten Zellen (n=5).

Rein lichtmikroskopisch waren die bovinen Nebennierenmarkzellen direkt nach der Präparation in Suspension kaum von den Nebennierenrindenzellen zu unterscheiden.



### 7.1.4 Lichtmikroskopische Darstellung von bovinen NNMZ in Kultur

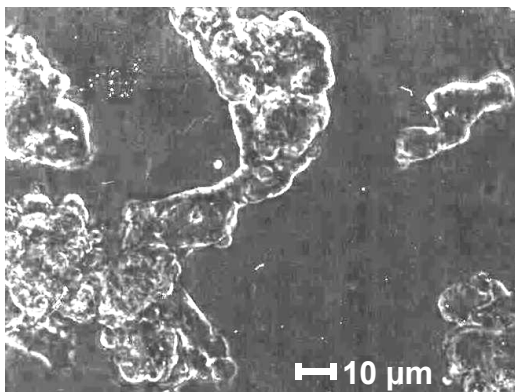


**Abb. 29:**  
**NNMZ in Kultur,**  
**26 Std. nach der Präparation.** ( $8 \times 10^6$  Zellen in  
 5 ml Medium)

Je  $8 \times 10^6$  lebende, isolierte bovine Nebennierenmarkzellen von Rindern wurden direkt nach der Präparation mit 8 ml Medium (gleiches Medium wie für Nebennierenrindenzellen) in einer 80 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche inkubiert. Es zeigte sich, dass eine Beschichtung mit Rattenschwanzkollagen für eine Zellanheftung am Boden der Zellkulturflasche unbedingt nötig war. Ebenso wurde auch FKS verwendet.

Ohne Beschichtung allerdings fehlte die Anheftung vollkommen und das Zellbild entsprach auch nach 26 Stunden noch dem von runden Zellen in Suspension. Bei stabiler Anheftung zeigten die Nebennierenmarkzellen (Abb. 29) im Vergleich zu Nebennierenrindenzellen (Abb. 27) länger ausgezogene Zellausläufer [209]. Bei gleicher Zelldichte lag der Proteinwert der Nebennierenmarkzellen um den Faktor 2,4 höher als der der Nebennierenrindenzellen (n=6).

### 7.1.5 Lichtmikroskopische Darstellung von Zellen der PC12-Zelllinie in Kultur

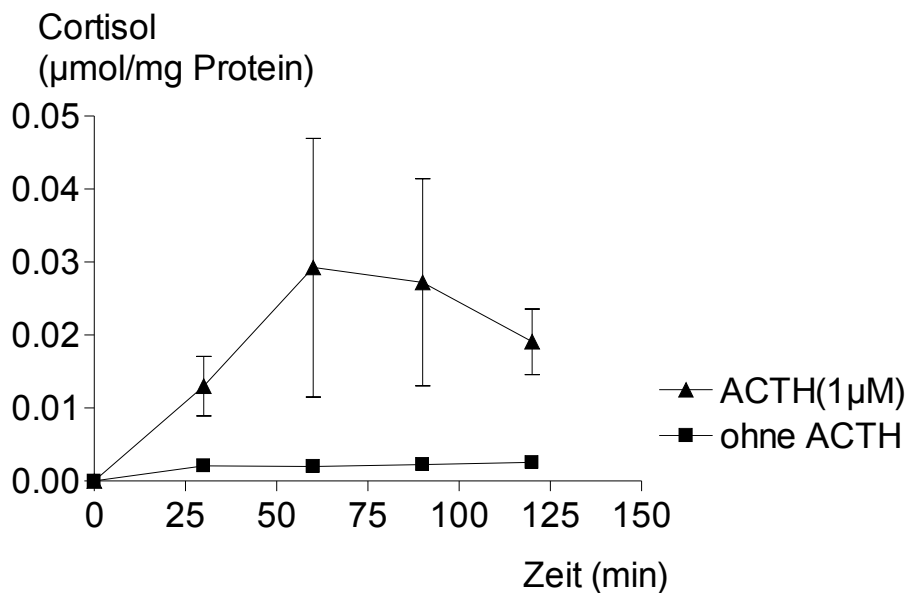


**Abb. 30:**  
**Zellen der PC12-Zelllinie,**  
**6 Tage nach Beginn der Kultivierung bzw.**  
**nach dem Splitten der Zellpopulation einer**  
**Zellkulturflasche**  
 Beschichtung des Kulturflaschenbodens mit FKS

Im Vergleich zu einer Beschichtung der Zellkulturflasche mit Kollagen (vgl. Kap. 4.6.2.), löste die Beschichtung mit FKS eine stabilere Anheftung der Zellen am Boden der Zellkulturflasche aus. Im Vergleich zu den bovinen Nebennierenrinden- und Nebennierenmarkzellen benötigten PC12-Zellen 24 Stunden bis zur Anheftung an den Kulturflaschenboden (Abb. 28).

## 7.2 Freisetzung von Cortisol aus NNRZ des Rindes in den Zellüberstand

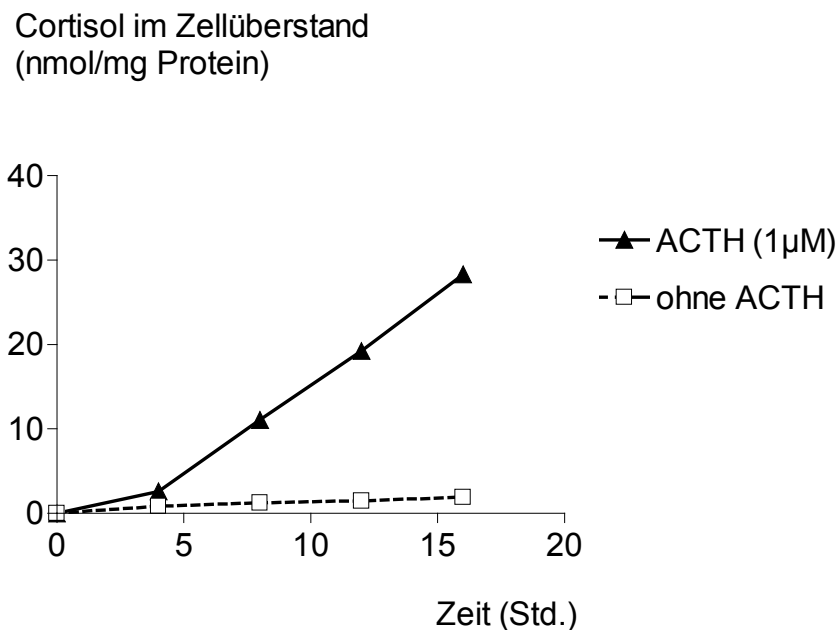
### 7.2.1 Vergleich zwischen der Cortisolfreisetzung aus NNRZ in Suspension und in Kultur



**Abb. 31:**  
Cortisolgehalt im Suspensionspuffer von Rinder NNRZ  
( $p \leq 0,05$ ;  $n=3$ ;  $\pm$ SEM).

Es wurde zunächst geprüft, ob die Funktionalität der Zellen in Suspension und in Kultur nach der hier beschriebenen Präparationsmethode eine Cortisolfreisetzung generell ermöglichte. Rinder-Nebennierenrindenzellen bleiben in Suspension über einen Zeitraum von 120 Minuten vital [198]. Im Gegensatz zur Messung der von bovinen NNRZ in Suspension freigesetzten Cortisolmenge befand sich die Ouabainfreisetzung am untersten Bereich der Nachweisgrenze. Auf die Messung der Ouabainfreisetzung von bovinen NNRZ in Suspension wurde daher verzichtet. Zur Messung der Cortisolfreisetzung von Rindernebenierenrindenzellen in Suspension wurden diese Zellen im Anschluss an die Präparation für eine Gesamtdauer von maximal 120 Minuten in Krebs-Ringer-Puffer unter Carbogen-Begasung bei 37°C in einem

Schüttelwasserbad inkubiert. Zum Zeitpunkt  $t_0$  (ca. 20 Minuten nach Ende der Präparation) erfolgte der Zusatz von ACTH (Endkonzentration  $1 \mu\text{M}$ ) und zu den in der Abb. 31 angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und dessen Cortisolgehalt gemessen. Es zeigte sich, dass die Cortisolfreisetzung über einen Zeitraum von 2 Stunden messbar war und in Anwesenheit von ACTH sehr deutlich gesteigert (Abb. 31).

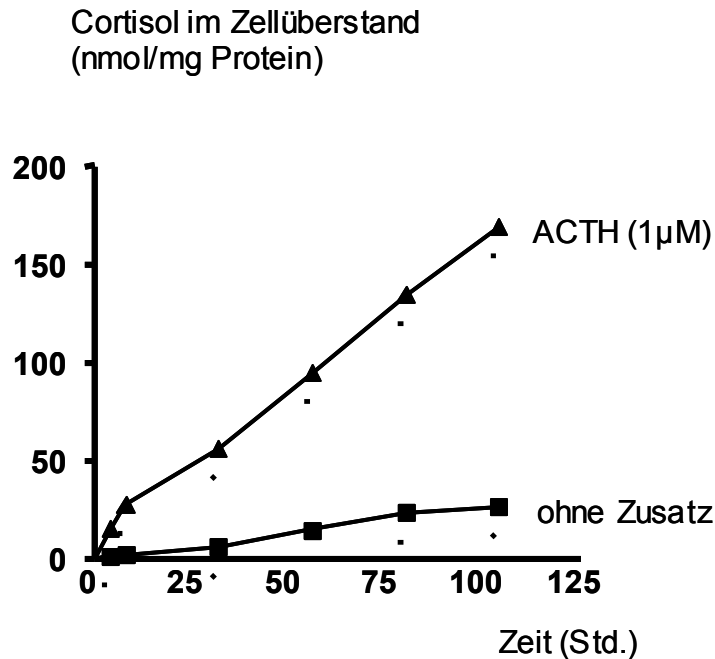


**Abb. 32:**  
**Bestimmung des Cortisolgehaltes im Zellüberstand von bovinen NNRZ über eine 16-stündige Inkubationsphase gemessen.** Die Messungen erfolgten an Rinder-NNRZ in Kultur ( $n=4$ ;  $\pm\text{SEM}$ ).

In den Kulturversuchen wurden die zu kultivierenden Rinder-Nebennierenrindenzellen vor Beginn der Hormon-Stimulation zunächst für 16 Stunden mit Medium bei  $37^\circ\text{C}$  und unter Carbogenbegasung im Brutschrank inkubiert (Aequilibrierungsphase). Diese Phase war für eine Anheftung der Zellen an den Kulturgefäßboden erforderlich. Danach wurden die Zellen mit ACTH ( $1 \mu\text{M}$ ) stimuliert ( $t_0$ ). Zu jedem Messzeitpunkt wurde der Zellüberstand gegen frisches Medium und ACTH ( $1 \mu\text{M}$ ) ausgetauscht. Die Cortisolsekretion der Zellen war ab  $t_0$  über einen Inkubationszeitraum von 16 Stunden (Abb. 32) und darüber hinaus bis hin zu mehreren Tagen (Abb. 33) messbar.

Die nach 120 Minuten unter ACTH-Zusatz insgesamt von Zellen in Suspension freigesetzte Cortisolmenge betrug  $1,0 \pm 0,5 \mu\text{g/mg Protein}$  (Abb. 31). Rinder-Nebennierenrindenzellen in Kultur erreichten am Ende einer 16-stündigen Kultivierung insgesamt eine Cortisolmenge von  $0,9 \pm 0,03 \mu\text{g/mg Protein}$  (Abb. 32).

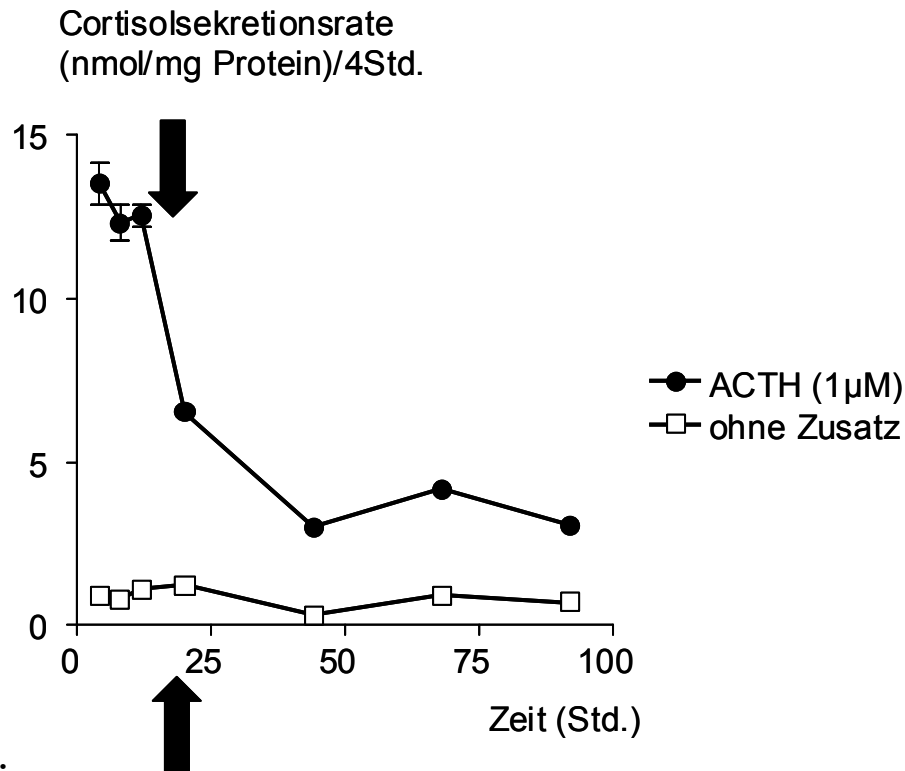
Es zeigte sich damit, dass frisch isolierte Zellen in Suspension innerhalb eines 8-fach kürzeren Zeitraumes mehr Cortisol freisetzen als Zellen in Kultur und dass daher dieser Unterschied zwischen Zellen in Suspension und Zellen in Kultur für einen Vergleich berücksichtigt werden musste. Sowohl Zellen in Suspension als auch Zellen in Kultur eigneten sich jedoch vorzüglich zur Messung der Cortisolfreisetzung.



**Abb. 33:**  
**Messung des Cortisolgehaltes im Zellüberstand während Langzeitkultivierung von**  
**bovinen NNRZ (über mindestens 5 Tage hinweg).**  
 ( $p \leq 0,001$ ,  $n=3$  bis  $n=5$ ;  $\pm$ SEM; die SEM-Werte liegen in der Größenordnung der Symbole )

Abbildung 33 zeigt, dass eine Kultivierung auch über einen Zeitraum von mehr als 16 Stunden hinaus bis z.B. 120 Stunden möglich war und dass bei regelmäßigem Austausch des verbrauchten Mediums, inclusive ACTH, auch der Effekt der Stimulation der Freisetzung nachweisbar war. Ohne beobachtbare lichtmikroskopische Veränderungen der Zellen, war die Kultivierung der primären Rinder-Nebennierenrindenzellen sogar bis über 3 Wochen hinaus möglich.

## 7.2.2 Sekretionsrate für Cortisol in Abhängigkeit vom Alter der Zellkultur



**Abb. 34:**  
Bestimmung der Cortisolsekretionsrate von bovinen NNRZ bei vierstündiger Akkumulationsphase und einem Gesamtinkubationszeitraum von 92 Stunden ( $n=4$ ;  $\pm$ SEM).

Um die für weitere ACTH-Stimulationsversuche stärkste Sekretionsphase zu finden, wurde die Cortisolsekretionsrate in vierstündigen Zeitabständen über 92 Stunden Dauer gemessen ( $t_0$ = Beginn der ACTH-Stimulation nach 16-stündiger Aequilibrierungsphase).

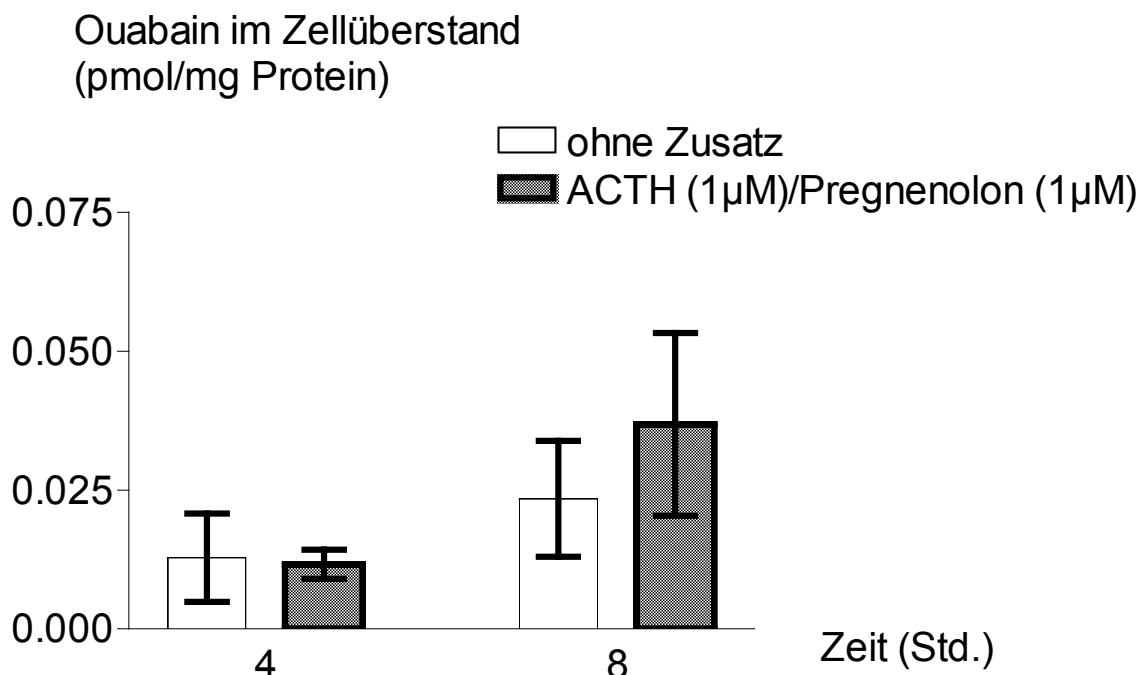
Es zeigte sich dabei, dass die Sekretionsrate für Cortisol bis zu einer Inkubationszeit von 16 Stunden konstant blieb, anschließend aber um 54% abnahm (Abb. 34). Für die Durchführung von Stimulationsversuchen mit kultivierten Rinder-Nebennierenrindenzellen eignete sich somit der Zeitraum der ersten 16 Stunden nach der vorausgegangenen 16-stündigen Aequilibrierungsphase.

## 7.3 Freisetzung von Ouabain aus NNRZ des Rindes in den Zellüberstand

### 7.3.1. Vergleich zwischen der Ouabainfreisetzung aus NNRZ in Suspension und in Kultur

Ebenso wie die Cortisolfreisetzung, wurde auch die Ouabainfreisetzung der Rinder-Nebennierenrindenzellen in Suspension und in Kultur gemessen.

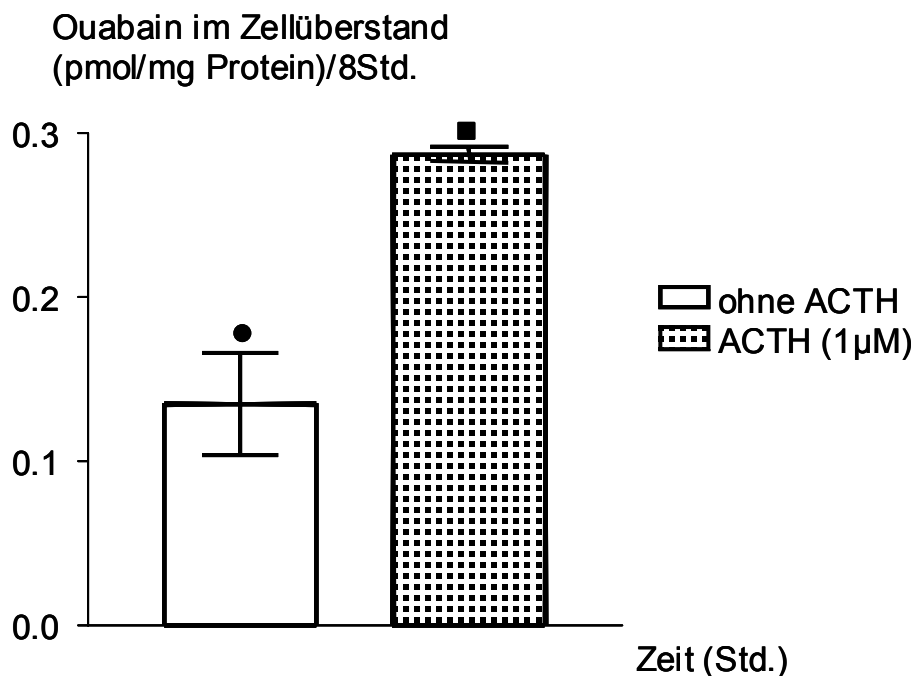
Da eine Ouabainfreisetzung unterhalb einer Inkubationszeit von 120 Minuten nicht nachzuweisen war, wurden Nebennierenrindenzellen in Suspension generell für mindestens 4 bzw. 8 Stunden inkubiert (Abb. 35). Erst nach diesen Inkubationszeiten war eine Ouabainfreisetzung nachweisbar (Abb. 35); signifikante Unterschiede zwischen Zellen, die mit ACTH (1 $\mu$ M) und Pregnenolon (1 $\mu$ M) stimuliert worden waren, und ihren unbehandelten Kontrollzellen waren jedoch nicht messbar.



**Abb. 35:**  
**Ouabaingehalt im Zellüberstand von NNRZ des Rindes in Suspension nach 4- bzw. 8-stündiger Inkubation.**  
(n=6;  $\pm$ SEM)

In Suspension zeigten Nebennierenrindenzellen des Rindes nur eine geringgradige Zeitabhängigkeit der Ouabainfreisetzung (wie in Abb. 35 gezeigt, trotz Stimulation durch

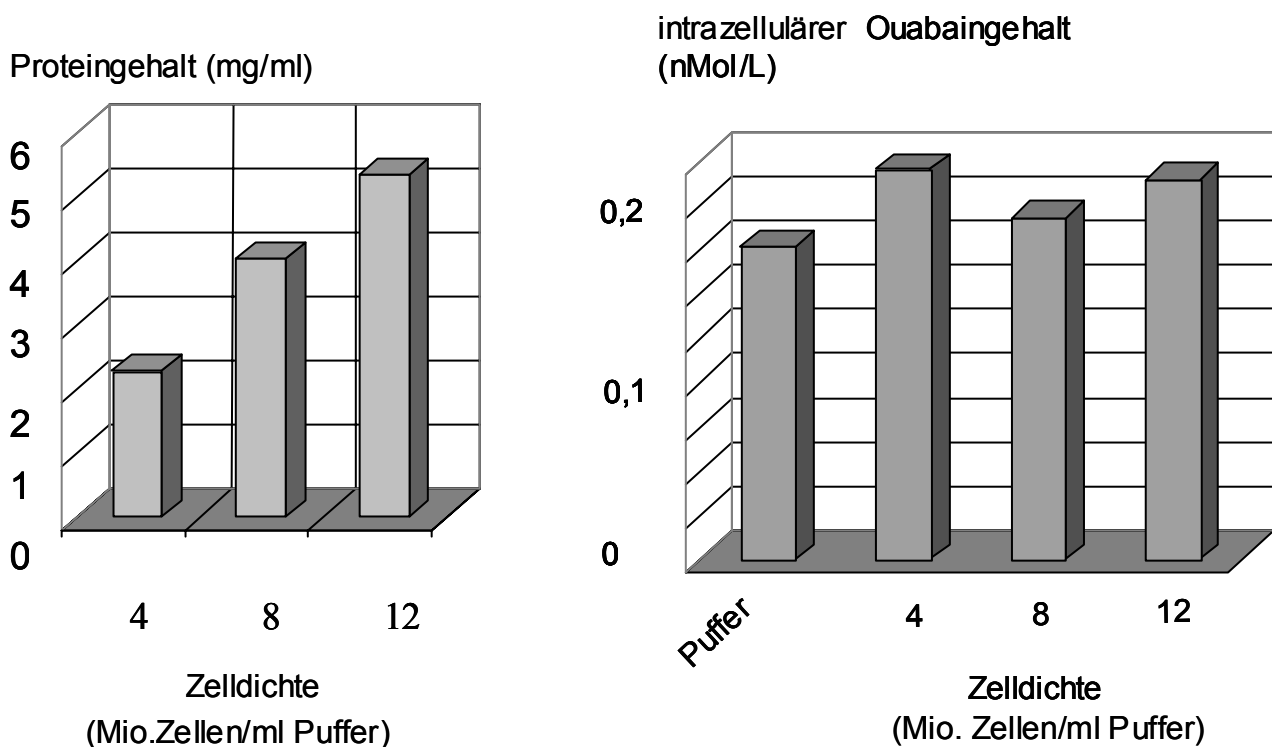
ACTH und Pregnenolon). Diese wurde jedoch deutlich sichtbar, wenn die Zellen in Kultur genommen wurden (Abb. 36). Die Ouabainsyntheserate war dann um den Faktor 10 höher, wenn die Zellen zunächst nach der Präparation eine 16-stündige Aequilibrierungsphase erfahren hatten und danach für 4 bzw. 8 Stunden mit einem Stimulans (ACTH) inkubiert wurden (Abb. 36). Die Unterschiede zwischen der Ouabainfreisetzung von unbehandelten und ACTH-stimulierten Zellen waren auf diese Weise signifikant (Abb. 36). Somit wurde deutlich, dass sich *Zellen in Suspension* für die weiteren Versuche zur Biosynthese bzw. der Steuerung der Freisetzung des Ouabains nicht eigneten. Die Zellen mussten dafür in Kultur genommen werden.



**Abb. 36:**  
**Ouabaingehalt im Zellüberstand von bovinen NNRZ nach vorheriger 16-stündiger Phase der Kultivierung zwecks Anpassung der Zellen an die Kulturbedingungen und anschließender Messung des Ouabaingehaltes im Zellüberstand nach 8-stündiger Kultivierung.** ( $t_0$  = 16 Stunden nach Präparation); (●/■  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM).

## 7.4. Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen an Ouabain und Cortisol in NNRZ

Zur Bestimmung des intrazellulären Gehalts an Ouabain bzw. Cortisol, müssen die Zellmembranen nach dem Entfernen des Mediums aufgelöst werden. Wir fanden, dass im Gegensatz zum Bericht von Laredo et al., 1994 [50] und Hamlyn et al., 2003 [63], die Behandlung von Zellen durch Frieren/Tauen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zur vollständigen Freisetzung des intrazellulären Ouabains aus seinen Bindungen bzw. Kompartimenten nicht ausreichte. Dies wird aus einem Vergleich der Abbildungen 37a und 37b deutlich:



**Abb. 37a:**  
**Proportionalität der Proteinkonzentration zur eingestellten Zelldichte bei konstantem Suspensionsvolumen.** Der Proteingehalt verhält sich direkt proportional zur eingestellten Zelldichte.

**Abb. 37b:**  
**Ouabainkonzentration lysierter NNRZ in konstantem Suspensionsvolumen als Funktion der Zelldichte.**

Der intrazelluläre Ouabaingehalt nach Lyse der Zellen durch Tieffrieren verhält sich nicht proportional zur eingestellten Zelldichte. Diese Proportionalität hätte aber bei korrektem Nachweis des Ouabains vorliegen müssen.

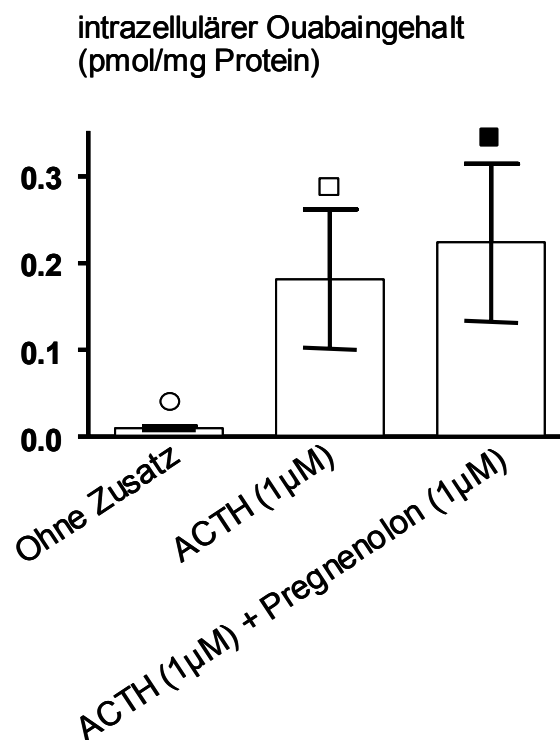
Nach dem Frieren/Tauen stieg trotz zunehmender Zellzahl (Abb. 37a) die Ouabainkonzentration (Ouabain, freigesetzt aus den lysierten Zellen) im konstanten



Suspensionsvolumen nicht proportional an (Abb. 37b). Mit der Zellzahl stieg aber, wie erwartet, die Proteinkonzentration (Abb. 37a).

Auch bei Zusatz stimulierender Hormone (z.B. ACTH 1 $\mu$ M, Pregnenolon 100 $\mu$ M) zum Kulturmedium waren (vgl. [50]) keine signifikanten Unterschiede des intrazellulären Ouabaingehaltes messbar. Wenn jedoch die Zellen für 5 Minuten zusätzlich mit Ultraschall behandelt wurden, stellten wir Unterschiede im intrazellulären Ouabaingehalt fest (Abb. 38). Daher wurde bei allen nachfolgenden Bestimmungen intrazellulärer Ouabaingehalte die Ultraschallbehandlung zusätzlich zum Einfrier-/Auftau-Verfahren angewendet.

Wenn intrazelluläres Cortisol bestimmt wurde, führte eine zusätzliche Ultraschallbehandlung nicht zu veränderten Messdaten; hier war das Auflösen der Zellen durch Frieren/Tauen ausreichend.



**Abb. 38:**

**Intrazellulärer Ouabaingehalt in Rinder-NNRZ nach 8-stündiger Inkubation mit ACTH (1 $\mu$ M) bzw. Pregnenolon (1 $\mu$ M) ( $t_0$ = 16 Stunden nach der Präparation). Die Messung erfolgte nach Auflösen der Zellen durch Tieffrieren und zusätzlicher Ultraschallbehandlung der Proben (○/□:  $p=0,051$ ; ■/□:  $p>0,4$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)**

## **7.5. Untersuchung der Ouabainsynthese in primären NNMZ und Zelllinien**

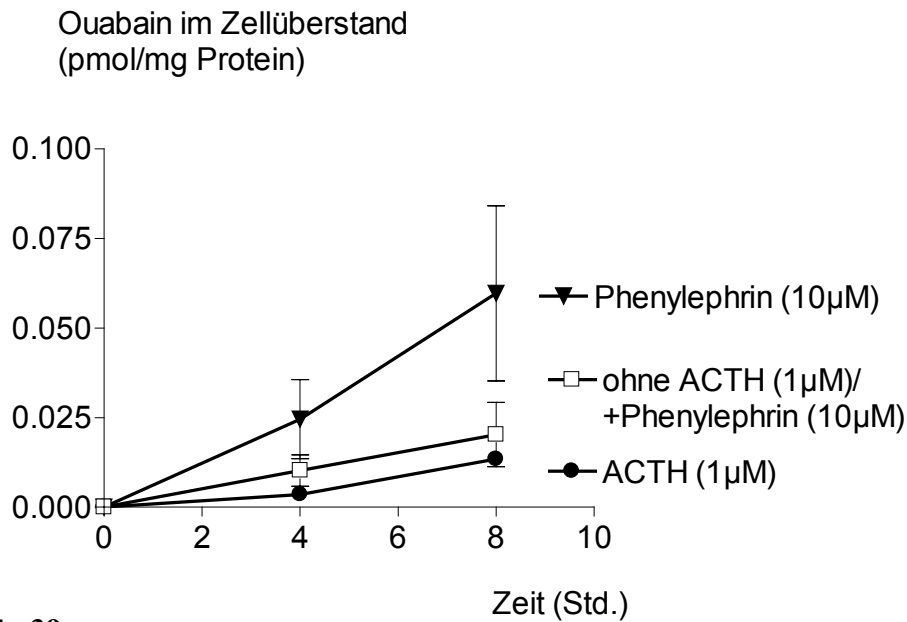
Studien zur Biosynthese und zur Regulation der Freisetzung von Ouabain aus Nebennierenzellen brauchen vor allem ein Zellsystem, das gut nachweisbare Mengen an Ouabain synthetisiert und freisetzt. Wir haben daher zunächst verschiedene Zellsysteme auf diese Frage hin getestet.

Um herauszufinden, ob Ouabain auch vom Nebennierenmark gebildet wird, wurden die Versuche an Nebennierenmarkzellen ebenso wie bei Nebennierenrindenzellen durchgeführt (Kap. 7.5.1.).

Da die Zellqualität primärer Zellen individuell sehr stark schwanken kann, wurde für diese Studie nach einer Zelllinie gesucht. Eine geeignete Zelllinie sollte vergleichbare Syntheseleistungen wie primäre Nebennierenzellen des Rindes aufweisen. Daher wurden nachstehend Ratten-Phäochromozytomzellen (PC12-Zellen, Kap. 7.5.2) und Zellen einer humanen Nebennierenrinden-Zelllinie mit primären Nebennierenzellen des Rindes verglichen (Kap. 7.5.3).

### **7.5.1. Untersuchungen an primären NNMZ**

Frisch isolierte Zellen aus dem Nebennierenmark wurden für 16 Stunden in Kulturflaschen inkubiert, deren Gefäßboden zuvor mit Kollagen beschichtet worden war (vgl. Kap. 4.6.2). Diese Inkubationsphase diente (ebenso wie bei den Nebennierenrindenzellen) der Anheftung und Stoffwechselanpassung der Zellen. Anschließend wurden die Stimulationsversuche nach dem bereits vorgestellten Schema durchgeführt (vgl. Kap. 4.8.1).



**Abb. 39:**  
**Ouabaingehalt im Zellüberstand von primären NNMZ in Kultur**  
(n=3 bis n=6;  $\pm$  SEM).

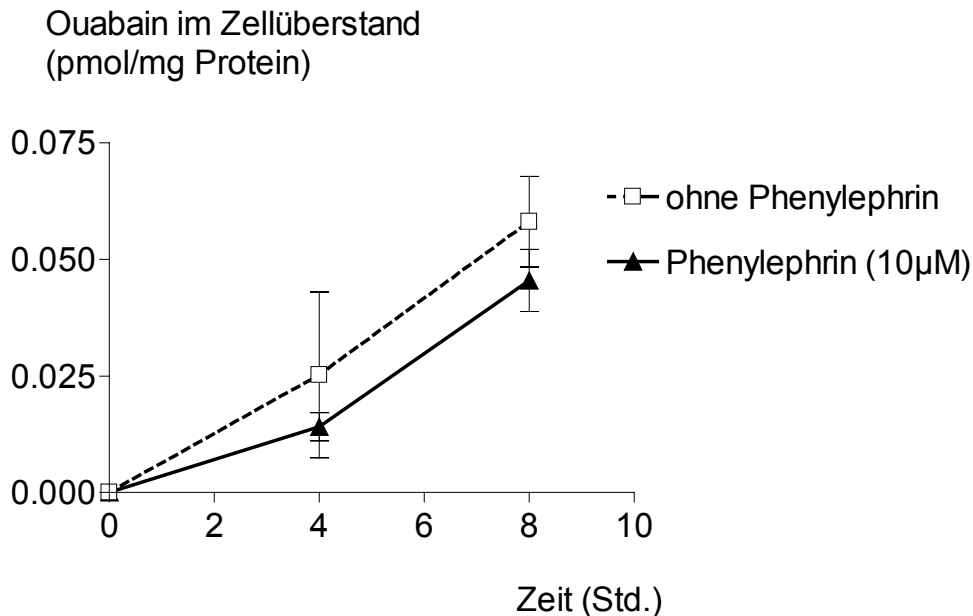
ACTH (1µM) zeigte selbst innerhalb von 8 Stunden keinerlei Wirkung auf die Ouabainfreisetzung (Abb. 39) was von den Ergebnissen von Laredo et al. [50, 53] und Kawamura et al. (1984) abweicht [210]. Laredo verwendet Inkubationszeiten von 2 bis maximal 4 Stunden, Kawamura et al. 1 Stunde und beide finden eine signifikante Stimulierung der Ouabainfreisetzung. Ebenso löste auch Phenylephrin, ein  $\alpha$ -Sympathomimetikum, bei unseren Messungen keine signifikante Stimulation der Ouabainfreisetzung ( $p > 0,05$ ) aus (Abb. 39).

Da sich die insgesamt freigesetzten Ouabainmengen darüber hinaus auch noch nach achtstündiger Inkubation unterhalb von 0,1 pMol /mg Protein bewegten - einem Wert, der an der unteren Grenze der Nachweisbarkeit von Ouabain im ELISA-Verfahren liegt, - wurden keine weiteren Experimente an Nebennierenmarkzellen des Rindes durchgeführt. Offensichtlich können primäre Zellen des Nebennierenmarks keine wesentlichen Mengen an Ouabain synthetisieren.

### 7.5.2. Untersuchungen an Zellen der PC12-Zelllinie

Um anstelle primärer boviner Nebennierenrindenzellen die Zellen der PC12-Zelllinie einsetzen zu können, sollten sich diese Zellen gegenüber den Substanzen, die bekanntermaßen die Freisetzung und Biosynthese regulieren, gleich verhalten. Es wurde daher untersucht, ob

sich PC12-Zellen (Zellen eines Ratten-Phäochromozytoms) mit Phenylephrin stimulieren lassen. Dazu wurde experimentell wie im Kapitel 4.8.3. beschrieben vorgegangen.



**Abb. 40:**  
**Ouabaingehalt im Zellüberstand von Zellen der PC12-Zelllinie** ( $p < 0,18$ ;  $n=2$ ;  $\pm$ SEM).

Wie die primären Nebennierenmarkzellen des Rindes (Abb. 39), zeigten auch die PC12-Zellen von Ratten keine signifikante Stimulierung ( $p > 0,18$ ) der Ouabainfreisetzung durch Phenylephrin (Abb. 40). Wegen des Fehlens einer hormonellen Stimulierbarkeit, aber auch wegen der geringen Ouabainsyntheseraten, wurde die PC12-Zelllinie nicht weiter verwendet.

### 7.5.3. Studien an der humanen NNRZ-Linie (NCI-295R)

Bei den Messungen mit Zellen der NCI-295R Zelllinie zeigte sich, dass weder ACTH noch Angiotensin II jeweils zu signifikanten Erhöhungen der Cortisolfreisetzung und -biosynthese führten. Da sich außerdem weder durch Forskolin und Angiotensin II noch durch ACTH eine Stimulierung der Ouabainsynthese und -freisetzung zeigen lies und dadurch keinerlei Übertragbarkeit auf primäre NNRZ gegeben war, wurde von einer weiteren Verwendung dieser Zelllinie Abstand genommen.

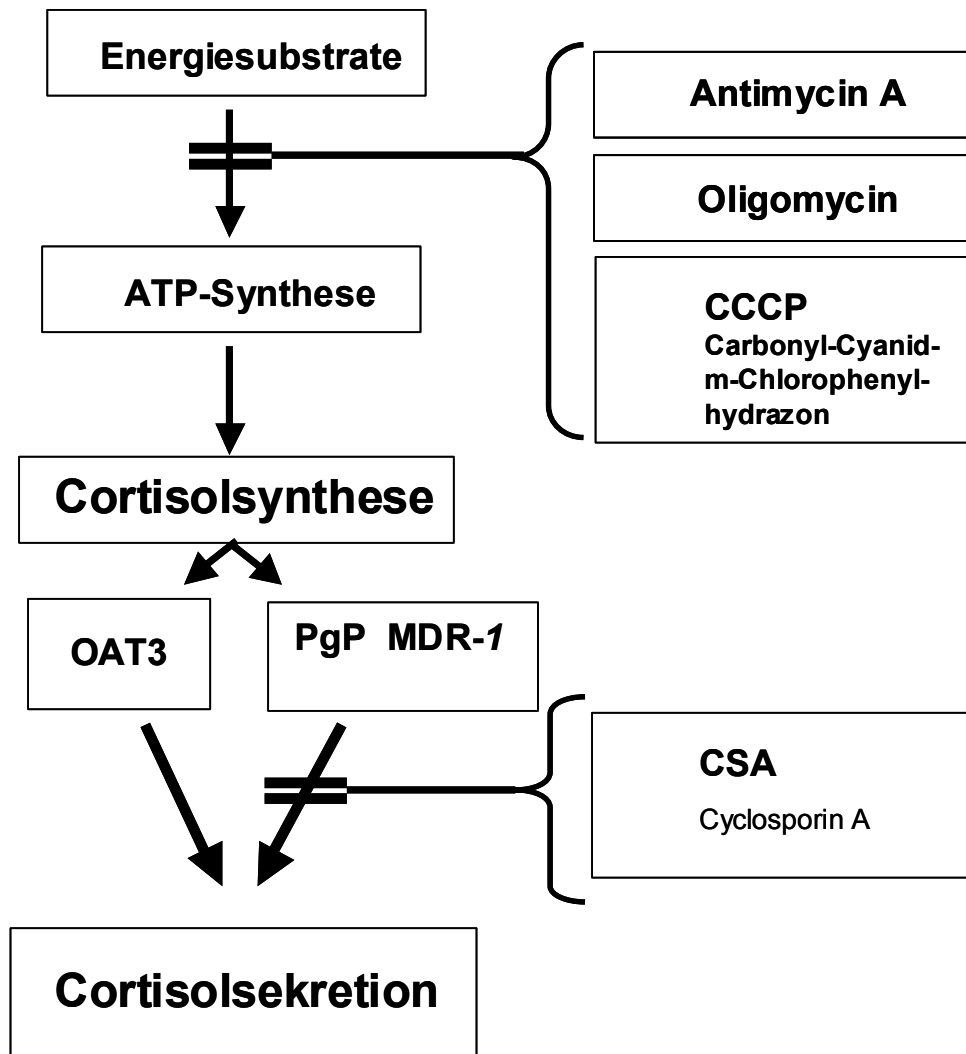
## **7.6. Energieabhängigkeit der Freisetzung und Biosynthese von Cortisol aus bovinen NNRZ**

Man vermutet, dass zur Cortisolsekretion ein ATP-abhängiger Transporter aus der Familie der ABC-Carrier (ATP-binding-Cassette proteins) dient und zwar genauer das P-Glycoprotein P, das auch als MDR1 bezeichnet wird [179], da es sich um das Genexpressionsprodukt des MDR1-Gens handelt.

Falls die Annahmen zutreffen, sollten sowohl Hemmstoffe der Atemkette als auch des MDR1-Transporters die Cortisolfreisetzung unterbinden (Abb. 41).

Wir haben daher an unterschiedlichen Stellen der ATP-Synthese wirkende Hemmstoffe eingesetzt (Abb. 41). Da solche Hemmstoffe nicht in jedem Fall sofort wirken, wurden Zeitabhängigkeiten von 2 bis 24 Stunden gemessen.

Als Hemmstoff der ACTH-stimulierten Cortisolsekretion wurde zunächst Antimycin A getestet, das den Elektronentransport vom Cytochrom b auf Cytochrom c1 bei der ATP-Synthese blockiert. Wir studierten auch die Wirkung von Oligomycin, das die mitochondriale ATP-Synthase hemmt, ebenso wie von Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon (CCCP), das als mitochondriales Protonenionophor und Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien die ATP-Synthese zum Erliegen bringt. Außerdem wurde Cyclosporin A (CSA) als ein Hemmstoff des MDR1-Transporters eingesetzt (vgl. Abb. 41).



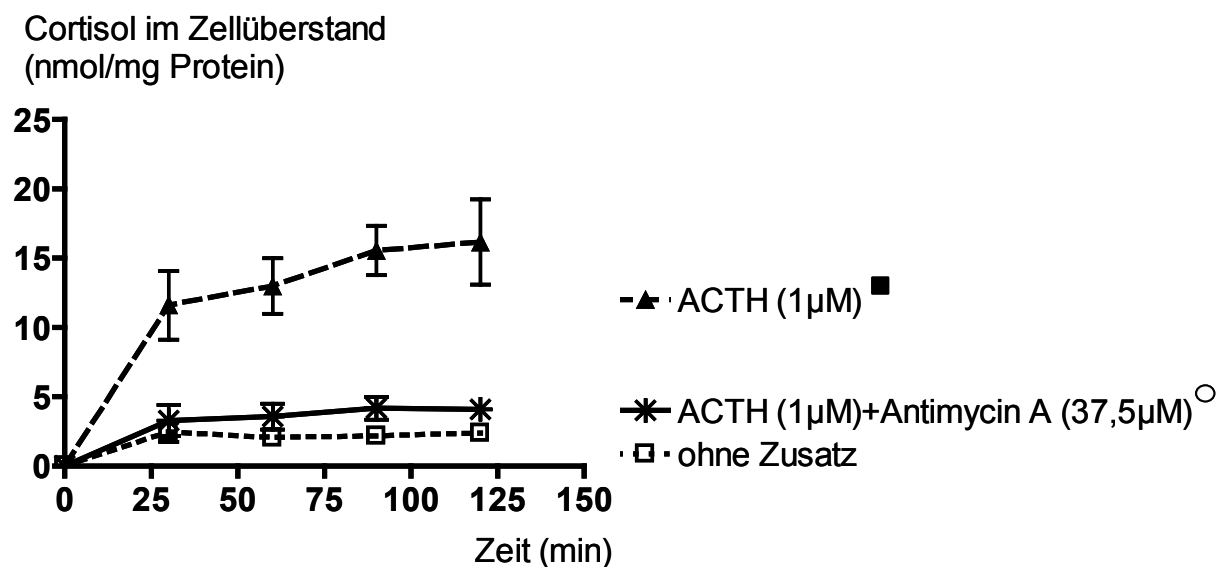
**Abb. 41:**

**Antimycin A, Oligomycin und Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon (CCCP) und Cyclosporin A (CSA) verursachen durch Hemmung der ATP-Synthese einen zellulären Energiemangel.** Falls es sich bei der Cortisolsynthese und –sekretion um energieabhängige Vorgänge handelt, werden diese infolge des zellulären Energiemangels gehemmt. Cyclosporin A blockiert den MDR1-Transporter und damit die Cortisolsekretion, falls sie durch den MDR1-Transporter vermittelt wird.

### 7.6.1. Energieabhängigkeit der *Freisetzung* von Cortisol aus Rinder-NNRZ in Suspension

Zu den frisch präparierten Zellen in Suspension wurde 10 Minuten nach Applikation des Antimycin A zusätzlich ACTH ( $1\mu\text{M}$ ) zugegeben (dieser Zeitpunkt entspricht jeweils  $t_0$  in den Abb. 42 ff.). Wie aus Abbildung 42 ersichtlich wird, hemmte Antimycin A die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion von Rinder-Nebennierenrindenzellen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Bereits 30 Minuten nach Beginn der Messung ( $t_0$ ) war eine nahezu vollständige Hemmung der ACTH-stimulierten Cortisolsekretion durch Antimycin A zu sehen ( $p < 0,001$ ), (Abb. 42). Sie blieb über den gesamten Inkubationszeitraum von 120 Minuten erhalten.

Antimycin A (Abb. 42) führte ebenso wie Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon (CCCP) mit einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  (Abb. 44) zu einer nahezu vollständigen Hemmung der ACTH-stimulierten Cortisolfreisetzung von bovinen Nebennierenrindenzellen in Suspension ( $p < 0,001$ ) (Abb. 44).



**Abb. 42:**  
Antimycin A hemmt die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion von Rinder-NNRZ in Suspension über 120 Minuten hinweg. (○/■:  $p < 0,001$   $n=5$ ;  $\pm$ SEM).

Durch Zugabe von Oligomycin ( $25,8\mu\text{M}$ ) konnte die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion von Nebennierenrindenzellen in Suspension nur geringgradig signifikant gehemmt werden ( $p < 0,05$ ), (Abb. 43).

Die zusätzliche Applikation von Oligomycin zu ACTH-stimulierten und CCCP-inhibierten bovinen Nebennierenrindenzellen löste keine zusätzlichen, messbaren Effekte aus (Abb. 44).

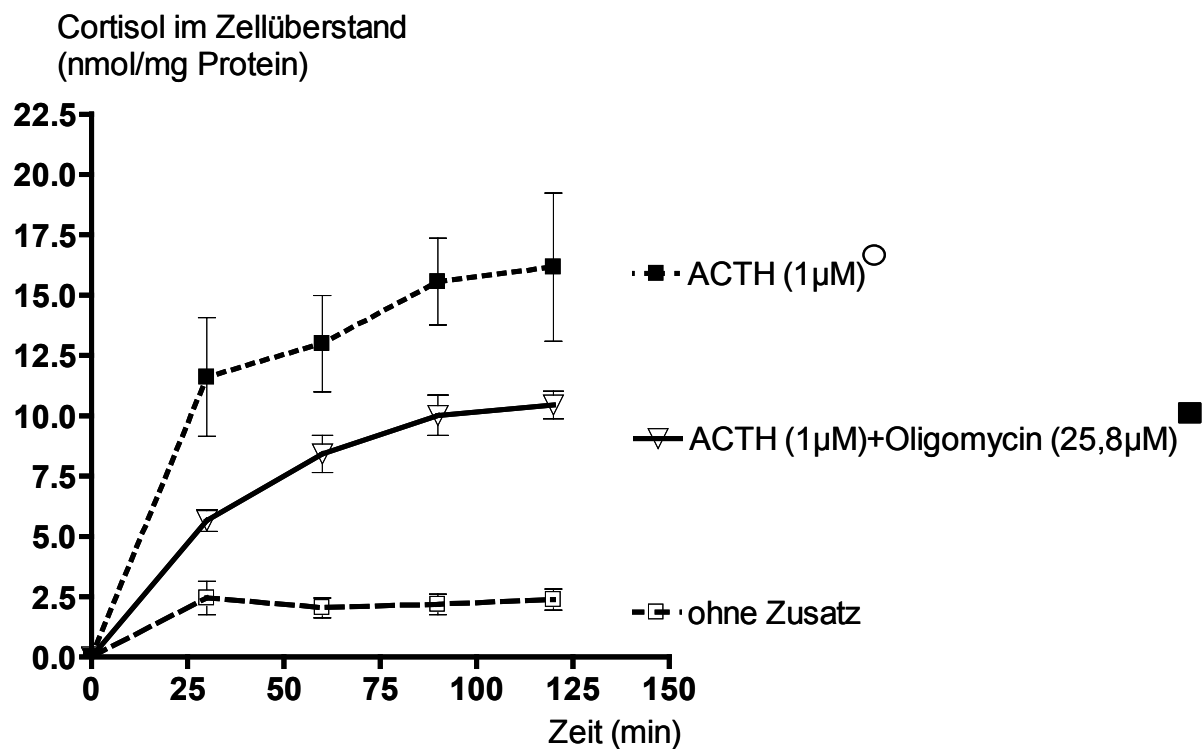


Abb. 43:

**Oligomycin (25,8  $\mu$ M) hemmt die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion aus Rinder-NNRZ in Suspension über 120 Minuten hinweg; ( $\circ/\blacksquare$ :  $p < 0,05$ ;  $n=5$ ;  $\pm$ SEM).**

Cyclosporin A (CSA), ein Hemmstoff des MDR1-Transporters, wirkte geringgradig schwächer inhibierend auf die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion boviner Nebennierenrindenzellen in Suspension (Abb. 45) als Antimycin A oder CCCP. Nur mit 100 nanomolarer Dosierung lag eine knapp signifikante Hemmung ( $p < 0,05$ ) der ACTH-stimulierten Cortisolsekretion vor. Die 1 nanomolare Konzentration reichte für einen signifikanten Effekt nicht aus (Abb. 45).



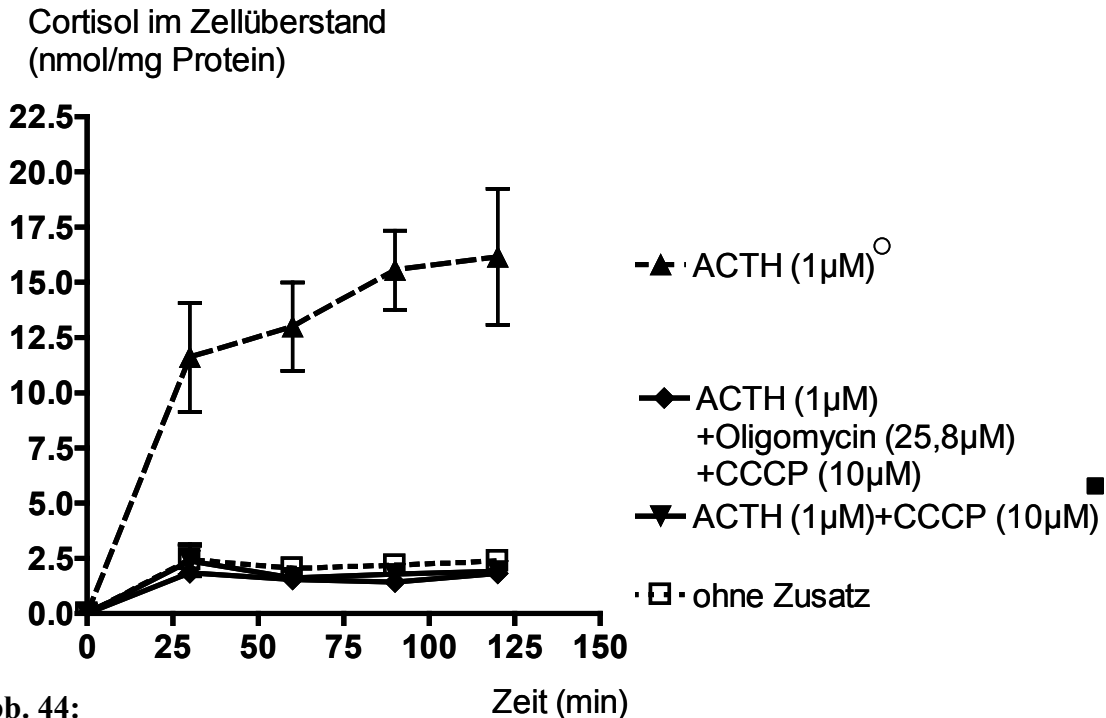


Abb. 44:  
CCCP führt zur nahezu vollständigen Inhibition der ACTH-stimulierten Cortisolsekretion von Rinder-NNRZ in Suspension über 120 Minuten hinweg. (○/■:  $p < 0,001$ ;  $n = 2$  bis  $n = 5$ ;  $\pm$ SEM)

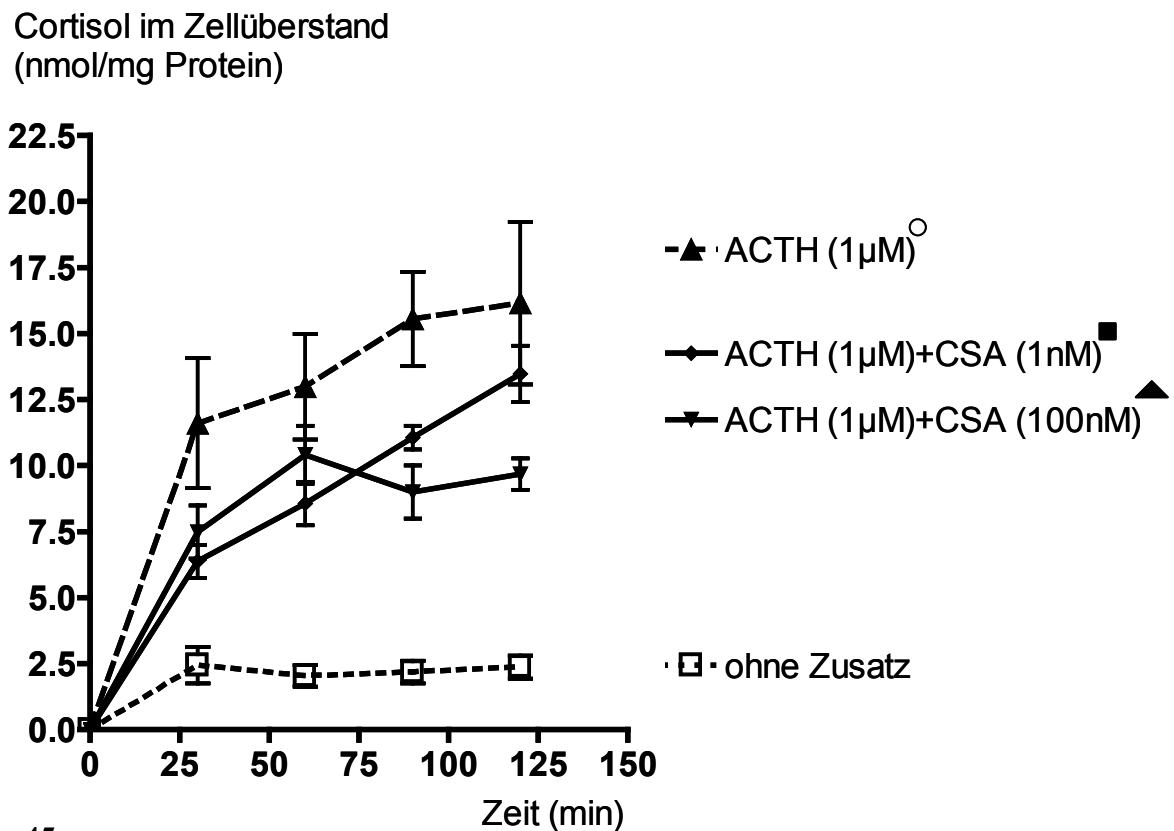


Abb. 45:  
CSA (100nM) hemmt die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion von Rinder-NNRZ in Suspension über 120 Minuten hinweg nur geringgradig. (○/▲:  $p < 0,05$ ; ○/■:  $p > 0,05$ ;  $n = 3$  bis  $n = 5$ ;  $\pm$ SEM)

Die deutlich hemmende Wirkung von CCCP und Antimycin A weist eine Energieabhängigkeit der an der Freisetzung des Cortisols beteiligten Prozesse nach. Cyclosporin A (CSA) wirkt schwach inhibierend. Wenn man von der Hypothese ausgeht, dass der MDR1-Transporter allein für die Cortisolsekretion verantwortlich ist, so stimmt dies offensichtlich nicht. Vielleicht ist der bisher vereinzelt diskutierte Transporter OAT 3 [184] zu einem weit höheren Anteil für den Export des Cortisols aus Nebennierenrindenzellen verantwortlich als bisher angenommen wird.

### **7.6.2. Energieabhängigkeit der *Freisetzung* von Cortisol aus Rinder-NNRZ in Kultur**

Die ACTH-stimulierte Abgabe von Cortisol kommt in frisch präparierten Nebennierenrindenzellen in Suspension bei Energie-Mangel zum Erliegen. Wir wollten aber auch wissen, ob sich die in Kultur genommenen Nebennierenrindenzellen ebenso verhalten. Nach den ersten 16 Stunden Aequilibrierungsphase erfolgte der Austausch des verbrauchten Zellüberstandes gegen frisches Medium, sowie der Zusatz der Hemmstoffe (Oligomycin, Antimycin A und CCCP). Dies wurde zu jedem Zeitpunkt der Zellüberstandsabnahme wiederholt, sodass der Zustand des Energiemangels der Zellen über den gesamten Inkubationszeitraum aufrecht erhalten wurde.

Wie bei den suspendierten Zellen erfolgte dabei jeweils zunächst die Verabreichung der Hemmstoffe (Oligomycin, Antimycin A, CCCP) und 10 Minuten später die des stimulierenden ACTHs ( $=t_0$ ).

Alle vier Stunden wurde der komplette Zellüberstand ausgetauscht und gegen frisches Medium inklusive der Zusatzsubstanzen in den angegebenen Endkonzentrationen ersetzt. Antimycin A und Oligomycin hemmten jeweils die ACTH-stimulierte Biosynthese des Cortisols über den gesamten Zeitraum von 48 h hinweg hochsignifikant ( $p < 0,001$ ), (Abb. 46). CCCP zeigte ebenfalls einen hochsignifikanten ( $p < 0,001$ ) und um 50% hemmenden Effekt auf die ACTH-stimulierte Cortisolbiosynthese über den gesamten Inkubationszeitraum von 20 Stunden hinweg (Abb. 47).

Die Daten beweisen - durch die hochgradig hemmende Wirkung des CCCP und des Antimycin A - die Energieabhängigkeit der Cortisolsynthese und -freisetzung. Dies gilt sowohl für Rinder-Nebennierenrindenzellen in Suspension (Kap. 7.6.1) als auch für diese Zellen in Kultur. Oligomycin hingegen wirkt nur an Zellen in Kultur inhibierend.

Cortisolgehalt im Zellüberstand  
(nmol/mg Protein)

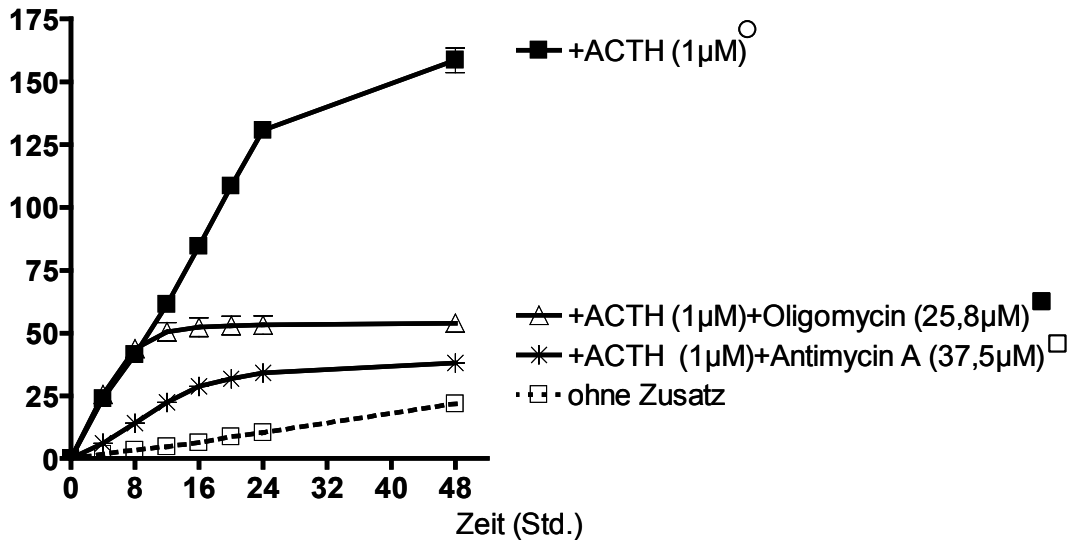


Abb. 46:

Antimycin A und Oligomycin hemmen die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion von Rinder-NNRZ in Kultur; zu jedem Messzeitpunkt erfolgte ein Austausch von Medium, ACTH und Oligomycin bzw. Antimycin. Die Konzentrationsverhältnisse wurden jeweils auf die Ausgangsverhältnisse eingestellt. (○/■:  $p < 0,001$ ; ○/□:  $p < 0,001$ ;  $n=3$  bis  $n=5$ ;  $\pm$ SEM; die SEM-Werte liegen in der Größenordnung der Symbole)

Cortisolgehalt im Zellüberstand  
(nmol/mg Protein)

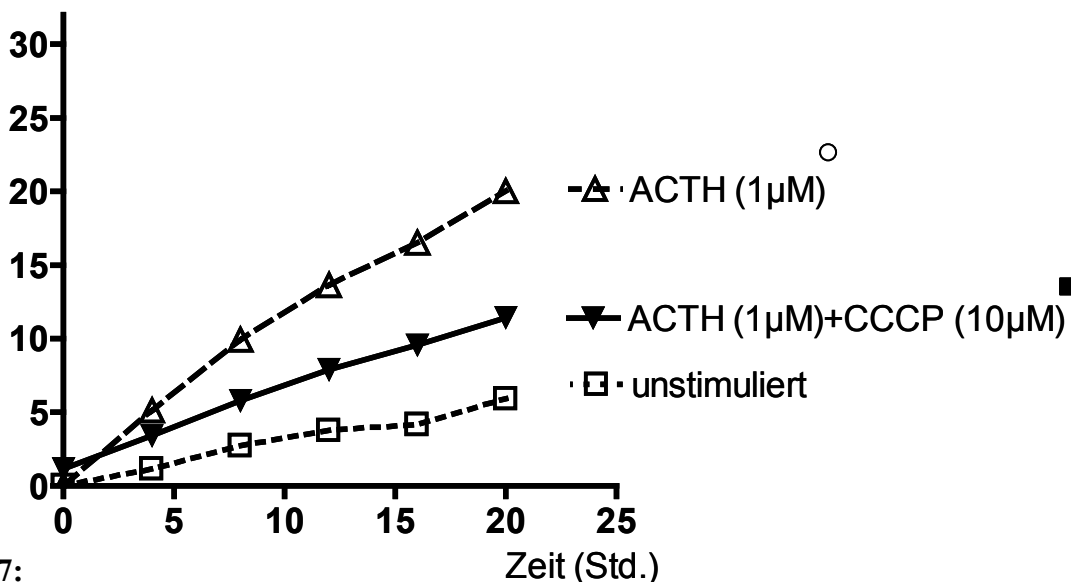


Abb. 47:

Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon (CCCP) hemmt die ACTH-stimulierte Cortisolfreisetzung von bovinen NNRZ über 20 Stunden hinweg; zu jedem Messzeitpunkt erfolgte ein Austausch von Medium, ACTH und CCCP. Die Konzentrationsverhältnisse wurden jeweils auf die Ausgangsverhältnisse eingestellt. (○/■:  $p < 0,001$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM; die SEM-Werte liegen in der Größenordnung der Symbole)

### 7.6.3. Die Energieabhängigkeit der *Biosynthese* von Cortisol durch Rinder-NNRZ in Suspension

Aus den vorangegangenen Untersuchungen ging hervor, dass ein Mangel an Energie die Cortisolsekretion von Nebennierenrindenzellen sowohl in Suspension als auch in Kultur vermindert. Es stellte sich nun die Frage, ob auch die Biosynthese von Cortisol in den Zellen durch Energiemangel messbar gehemmt werden kann. Uns interessierte besonders, ob die Cortisolsynthese über die Inkubationszeit unvermindert konstant bleibt.

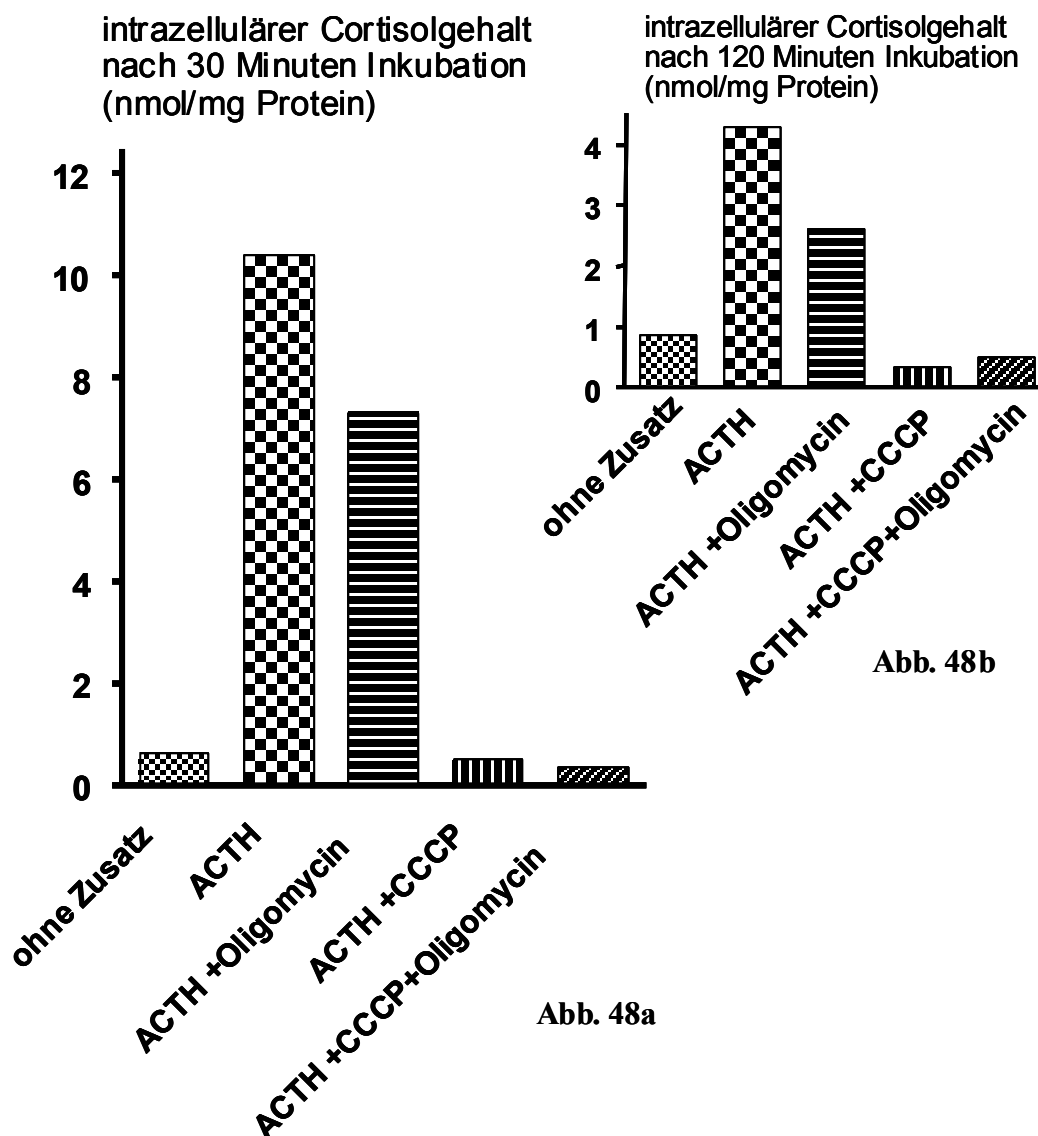


Abb. 48a, b:

Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazon (CCCP) (10 $\mu$ M) hemmt die ACTH (1 $\mu$ M)-stimulierte Cortisolbiosynthese sowohl bis 30 Minuten (Abb. 48a) als auch über 120 Minuten hinweg (Abb. 48b); Oligomycin (25,8 $\mu$ M) hat keinen deutlich hemmenden Effekt. Der intrazelluläre Cortisolgehalt sinkt mit zunehmender Inkubationszeit (vgl. Abb. 48a und b). Messung an Rinder-Nebennierenrindenzellen in Suspension als Vorversuch.

Deswegen wurden Voruntersuchungen an Nebennierenrindenzellen in Suspension über maximal 120 Minuten und an Zellen in Kultur über 24 Stunden (Kap. 7.6.4.) hinweg durchgeführt. Zur Erzeugung dieses Energiemangels wurden Oligomycin und CCCP eingesetzt. Dies wurde in einem Vorversuch mit NNRZ in Suspension untersucht (Abb. 48 a, b).

Die ACTH-stimulierte Biosynthese des Cortisols ist in Nebennierenrindenzellen von Rindern in Suspension energieabhängig, worauf die hemmende Wirkung von CCCP (10 $\mu$ M) hinweist (Abb. 48a, b). Oligomycin (25,8 $\mu$ M) alleine eingesetzt, löste eine geringgradige Hemmung aus und zeigte in Kombination mit CCCP keinen additiven Effekt (Abb. 48a, b). Ein Vergleich der beiden Abbildungen 48a und 48b zeigt des weiteren, dass der intrazelluläre Cortisolgehalt mit zunehmender Inkubationszeit (von Abb. 48a 30 Min. bis Abb. 48b 120 Minuten) abnimmt. Daher war es nun wichtig, die Energieabhängigkeit der Biosynthese von Cortisol durch Rinder-Nebennierenrindenzellen in Kultur zu messen.

#### **7.6.4. Energieabhängigkeit der *Biosynthese* von Cortisol durch Rinder-NNRZ in Kultur**

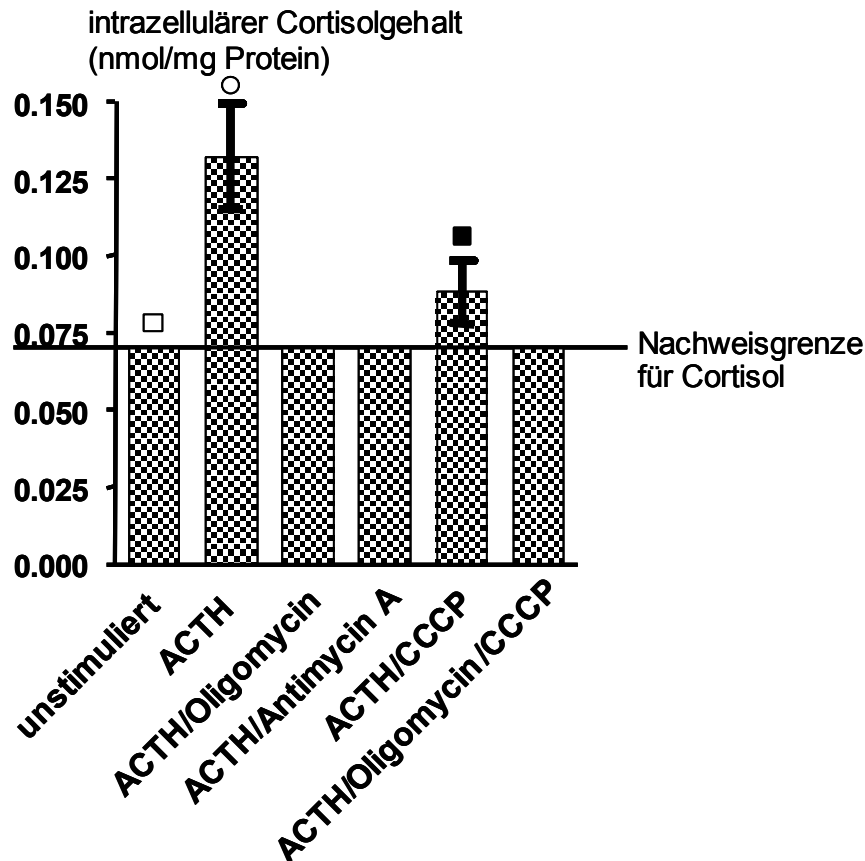
Wie in Kapitel 7.6.2 beschrieben, wurde der zelluläre Energiemangel über den gesamten Inkubationszeitraum von 24 Stunden dadurch aufrechterhalten, dass nach jeder Abnahme des Zellüberstandes (zur Messung der Cortisolsekretion, vgl. Kap. 7.6.2) das gleiche Gesamtvolumen an Medium und die gleichen Konzentrationen an Oligomycin, Antimycin A und CCCP im Medium wieder eingestellt wurden wie zu Beginn des Versuchs.

Da für die Messung des intrazellulären Cortisolgehaltes jedoch die Auflösung der Zellen erforderlich war, konnte der intrazelluläre Gehalt in Zellen, die sich in Kultur befanden, nur einmalig am Ende eines Versuches gemessen werden.

Oligomycin (25,8 $\mu$ M) und Antimycin A (37,5 $\mu$ M) lösten eine Hemmung der intrazellulären ACTH-stimulierten Cortisolbiosynthese aus und senkten die Cortisolgehalte bis auf das Niveau unbehandelter Zellen (Abb. 49). Dies war allerdings statistisch nicht als signifikant zu bezeichnen ( $p > 0,05$ ), da diese Werte (0,075 nmol/mg Protein) der minimalen Nachweisgrenze des RIA-Verfahrens zur Cortisol-Messung entsprechen und geringere Gehalte daher nicht messbar sind.

Antimycin A, Oligomycin und CCCP hemmten die Cortisolfreisetzung deutlich, Antimycin A und Oligomycin jedoch die Cortisolbiosynthese nicht signifikant. Die Energieabhängigkeit

der Cortisolfreisetzung und auch der -biosynthese lässt sich anhand der vorgestellten Versuche nachweisen, auch wenn sich die Energieabhängigkeit der Biosynthese aus messtechnischen Gründen nicht als statistisch signifikant bezeichnen lässt.



**Abb. 49:**  
**Intrazellulärer Cortisolgehalt kultivierter NNRZ des Rindes nach 24-stündiger Kultivierungszeit. Zugewetzt wurde (vgl. Säulenbezeichnung): ACTH (1 $\mu$ M), Oligomycin (25,8 $\mu$ M), Antimycin A (37,5 $\mu$ M) und CCCP (10 $\mu$ M).**  
 (□/○:  $p > 0,05$ ; ○/■:  $p > 0,05$ ; □/■  $p > 0,05$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)

## 7.7. Vergleich der stimulierenden Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Sekretion bzw. Biosynthese von Cortisol und Ouabain

ACTH ist ein stark stimulierendes Proteohormon der Biosynthese und Sekretion von Steroidhormonen, insbesondere von Cortisol [211, 212]. ACTH wird aber auch als Stimulator der Freisetzung des Steroidhormons Ouabain aus Nebennierenzellen beschrieben [4, 50, 165].

Weiterhin stimuliert auch Angiotensin II die Freisetzung von Ouabain aus Nebennierenzellen [50, 53, 165].

Da noch große Unklarheit über die Wege der Ouabainsynthese und über ihre Regulationsmöglichkeiten herrscht, wurde nachfolgend das Ausmaß der stimulierenden Wirkungen von ACTH und Angiotensin II auf die Biosynthese und Sekretion der beiden Steroidhormone, Cortisol und Ouabain, miteinander verglichen.

### **7.7.1. Stimulierende Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Freisetzung von Cortisol**

Nach einer Aequilibrierungsphase von 16 Stunden wurde primären NNRZ in Kultur ACTH (1 $\mu$ M) und Angiotensin II (100nM) zugesetzt (Abb. 54-57) und nach 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden der Zellüberstand zum Nachweis von Cortisol bzw. Ouabain (vgl. Kap. 4.8.1) vollständig abgenommen. Direkt nach jeder dieser Abnahmen wurde der von den Zellen entfernte Zellüberstand durch frisches Medium in gleichem Volumen ersetzt, ebenso auch die zu Beginn zugesetzten Dosen an ACTH bzw. Angiotensin II. Zu jedem Messzeitpunkt wurden dadurch wieder gleiche Ausgangsbedingungen geschaffen.

Mit 1 $\mu$ M ACTH stimulierte Nebennierenrindenzellen des Rindes erhöhten die Cortisolkonzentration im Zellüberstand nach 72 Stunden um den Faktor 4,9 ( $p < 0,001$ ), (Abb. 50), verglichen mit der unstimulierten Zellpopulation. ACTH wirkte hochgradig stimulierend auf die Cortisolsekretion von Rinder-Nebennierenrindenzellen.

Angiotensin II (100nM) steigerte die Cortisolkonzentration im Zellüberstand nach 72 Stunden geringgradig um das 2,3-fache ( $p > 0,05$ ; Abb. 50) gegenüber der unstimulierten Kontrollzellpopulation. Da ACTH jedoch die Cortisolfreisetzung 6-fach stimulierte (Abb. 50;  $p < 0,001$ ), ist Angiotensin II im Vergleich zu ACTH ein deutlich schwächer wirkendes Stimulans.

Eine Kombination aus ACTH (1 $\mu$ M) und Angiotensin II (100nM) führte nach 72-stündiger Inkubation -verglichen mit der unstimulierten Zellpopulation- zu einer 5,7-fachen Erhöhung der Cortisolkonzentration im Zellüberstand (Abb. 50). Damit stellte die Kombination aus ACTH und Angiotensin II einen geringen, nicht signifikanten Unterschied dar zur Cortisolsekretion von Zellen, die nur mit ACTH (1 $\mu$ M) stimuliert worden waren ( $p > 0,05$ ). Offensichtlich wirken die beiden Hormone nicht signifikant-additiv auf die Cortisolfreisetzung.

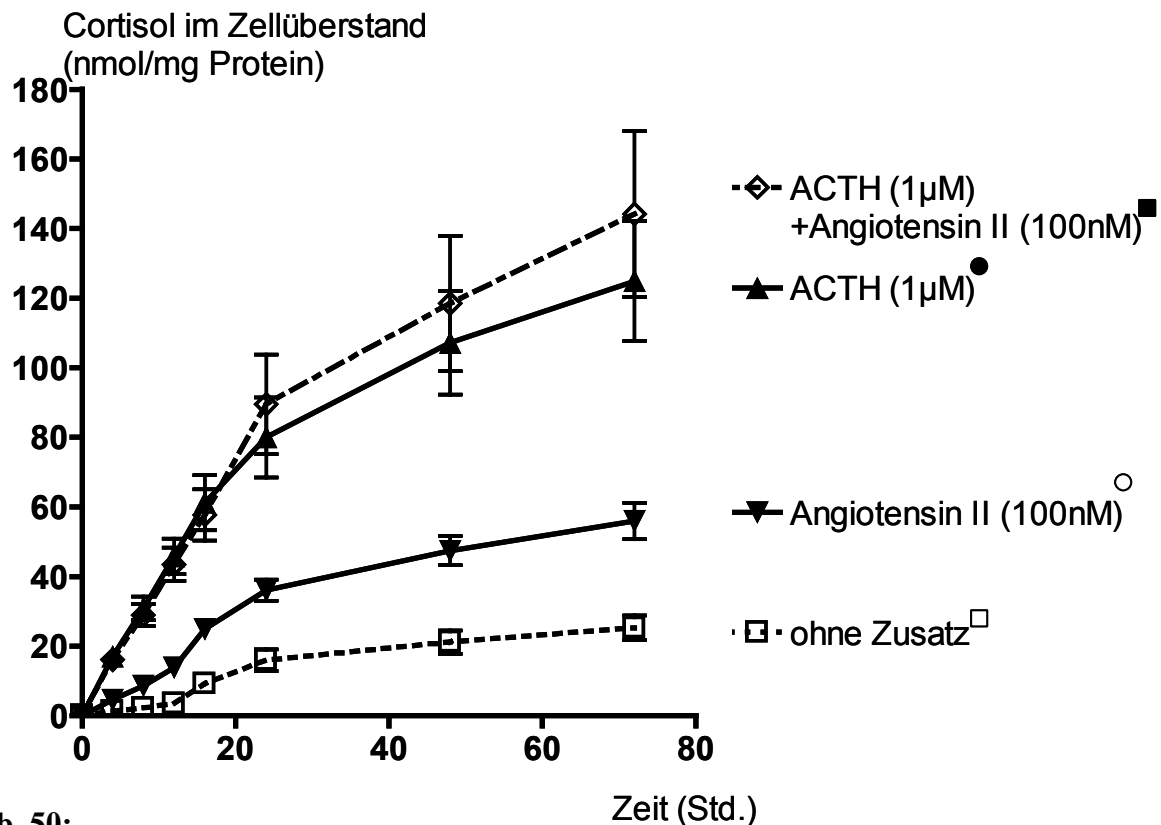


Abb. 50:

Die Stimulation der Cortisolsekretion durch ACTH (1µM) und Angiotensin II (100nM) an kultivierten Rinder-NNRZ ( $t_0$  = nach 16-stündiger Aequilibrierungs-phase). Nach 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände entfernt und vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Angiotensin II in den oben angegebenen Konzentrationen ausgetauscht.

(□/●:  $p < 0,001$ ; . □/○:  $p > 0,05$ ; ■/●:  $p > 0,05$ ;  $n = 8$  bis  $n = 12$ ;  $\pm$ SEM)

### 7.7.2. Stimulierende Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Freisetzung von Ouabain

Die Zellüberstände von Nebennierenrindenzellen unter ACTH (1µM) zeigten nach 72-stündiger Inkubation eine 1,9-fache, signifikante Steigerung ( $p < 0,001$ ) der Ouabainabgabe in den Zellüberstand (Abb. 51).

Angiotensin II (100nM) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Ouabainsekretion ( $p > 0,05$ ). Wenn die NNRZ mit Angiotensin II (100 nM) zusätzlich zu ACTH inkubiert wurden, war kein additiver Effekt im Vergleich zur allein durch ACTH stimulierten Sekretion zu sehen ( $p > 0,05$ ), (Abb. 51).



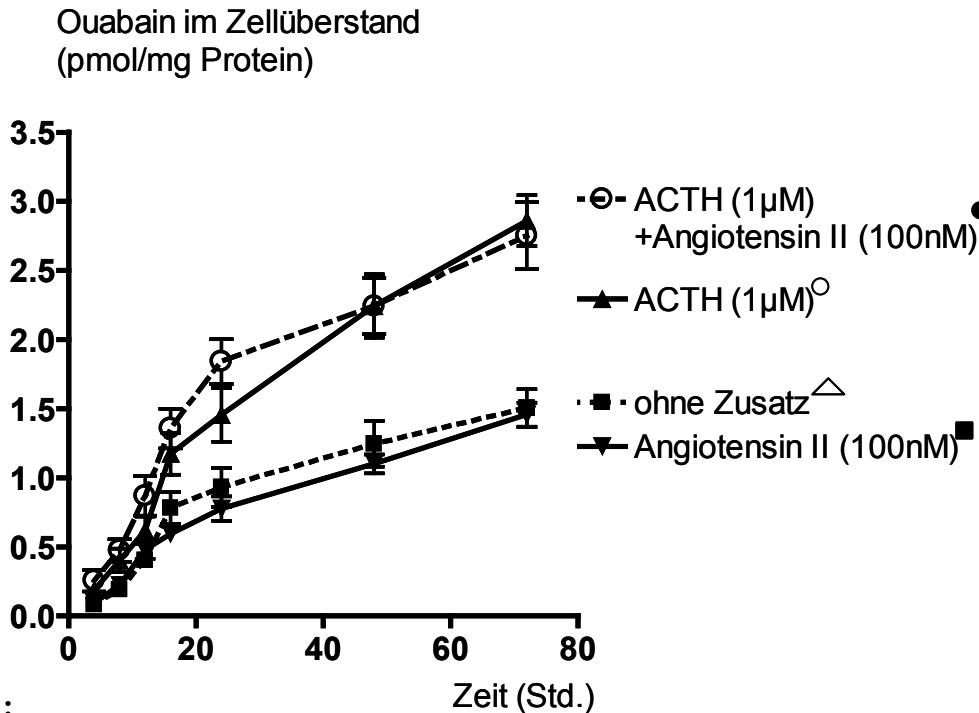


Abb. 51:

Die Stimulation der Ouabainfreisetzung durch ACTH (1µM) und Angiotensin II (100nM) an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 72-stündigen Inkubationsphase ( $t_0$ =16-stündige Aequilibrierungsphase). Nach 4, 8, 12, 16, 24, 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Angiotensin II in den oben angegebenen Konzentrationen ausgetauscht. (△/○:  $p \leq 0,001$ ; △/■:  $p > 0,05$ ; △/●:  $p \leq 0,001$ ; ●/○:  $p > 0,05$ ;  $n=12$ ;  $\pm$ SEM)

### 7.7.3. Stimulierende Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Biosynthese von Cortisol

In den am Boden der Kulturschale sitzenden Nebennierenrindenzellen wurden nach der Abnahme des Zellüberstandes am Ende der 72-stündigen Inkubationsphase die Cortisol- und Ouabainkonzentrationen gemessen. Dazu wurden die Zellen wie in Kap. 4.8.1. beschrieben solubilisiert (Abb. 52).

Wie Abbildung 52 zeigt, führte ACTH (1µM) zu einer hochgradigen, 42-fachen Steigerung der intrazellulären Cortisolkonzentration (Abb. 52), ( $p < 0,001$ ). Dagegen löste Angiotensin II (100nM) keine signifikante Steigerung aus ( $p > 0,05$ ), (Abb. 56). Wie zu erwarten, löste Angiotensin II keine weitere (additive) Cortisolfreisetzung aus, wenn dies zusätzlich zu ACTH im Kulturmedium zugegeben worden war. Die unter diesen Bedingungen zu

beobachtende 44,5-fache Steigerung (vgl. Kapitel 7.7.5, Tab. 14) der Cortisol-Bildung entsprach allein der stimulierenden Wirkung von ACTH.

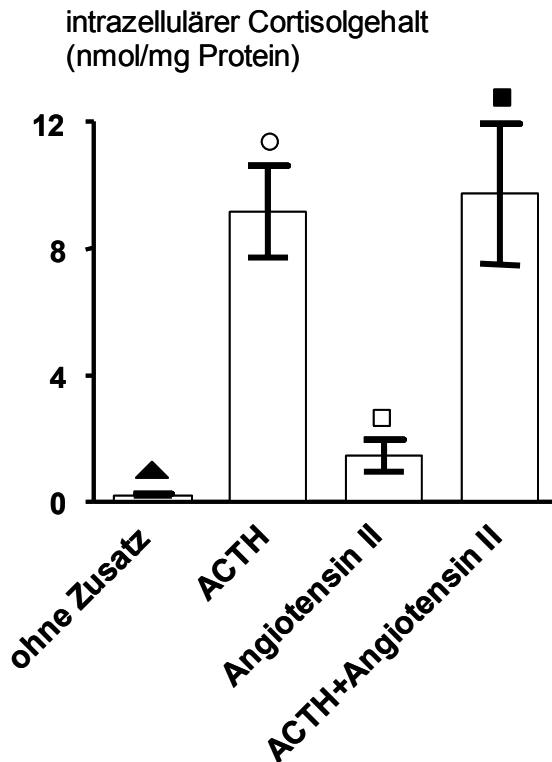


Abb. 52:

**Die Stimulation der Cortisolbiosynthese durch ACTH (1 $\mu$ M) und Angiotensin II (100nM) in Rinder-NNRZ in Kultur nach 16-stündiger Aequilibrierungsphase (=t<sub>0</sub>) und anschließender 72-stündiger Inkubationsphase.** Nach 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Angiotensin II in den oben angegebenen Konzentrationen ausgetauscht. Die gezeigten Daten wurden am Ende der insgesamt 72-stündigen Inkubationsphase erhoben.  
( $\blacktriangle$ /o: p< 0,001;  $\blacktriangle$ /■: p< 0,001;  $\square$ /o: p< 0,001;  $\square$ /■: p< 0,001;  $\blacktriangle$ /□: p> 0,05; o/■: p>0,05; n=8 bis n=12;  $\pm$ SEM)

#### 7.7.4. Stimulierende Wirkung von Angiotensin II und ACTH auf die Biosynthese von Ouabain

Wurde unter gleichen Inkubationsbedingungen die intrazellulären Ouabainkonzentrationen gemessen, so stimulierte 1  $\mu$ M ACTH die Ouabainsynthese jedoch nicht (p>0,05), (Abb. 53). Auch Angiotensin II oder die Kombination beider (ACTH (1 $\mu$ M) + Angiotensin II (100nM)) lösten keinen Effekt aus (Abb. 53), (p>0,03).

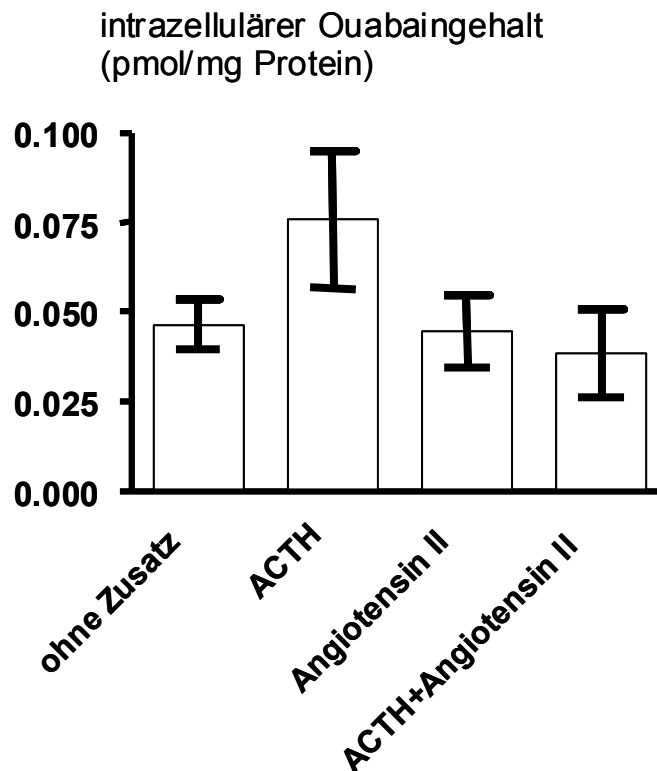


Abb. 53:

Die Stimulation der Ouabainbiosynthese durch ACTH (1 $\mu$ M) in Rinder-NNRZ in Kultur nach 16-stündiger Aequilibrierungsphase ( $=t_0$ ) sowie anschließender 72-stündiger Inkubationsphase. Angiotensin II (100nM) hat keinen Effekt. Nach 4, 8, 12, 16, 24 und 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Angiotensin II in den oben angegebenen Konzentrationen ausgetauscht. (keine signifikanten Unterschiede messbar; n=8 bis n=12;  $\pm$ SEM)

### 7.7.5. Zusammenfassung der Studien 7.7.1 bis 7.7.4

Die Zusammenfassung der Messwerte in Tabelle 14 zeigt, dass ACTH auf die Sekretion und die Biosynthese des Cortisols einen deutlich stärker stimulierenden Effekt ausübte als dies auf die Ouabainbiosynthese bzw. auf die Ouabainsekretion der Fall war. ACTH zeigte eine geringgradig stimulierende Wirkung auf die Ouabainfreisetzung und -biosynthese. Angiotensin II löste eine geringgradige Stimulation der Cortisolfreisetzung und -biosynthese aus, führte aber weder bei der Ouabainbiosynthese noch bei der Ouabainfreisetzung zu einem signifikant stimulierenden Effekt. Die fehlende Wirkung des Angiotensin II auf die Ouabainproduktion der Nebennierenrindenzellen steht im Widerspruch zu den bisher veröffentlichten Angaben [10, 50, 53].

**Tab. 14: Wirkung von ACTH bzw. Angiotensin II auf die Cortisol-/Ouabainbiosynthese und -sekretion von NNRZ des Rindes als Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen.** Zur Cortisolberechnung wurden die Cortisoldaten in der Einheit [nmol/mg Protein] und die Ouabaindaten in der Einheit [pmol/mg Protein] verwendet. Berechnungsgrundlage sind die in Kapitel 7.7.1 bis 7.7.4 vorgestellten Daten (Kulturversuche mit 16-stündiger Aequilibrierungsphase und anschließender 72-stündiger Inkubationsphase der Zellen; n=8 bis n=12;  $\pm$  SEM)

Steigerungsfaktor des Cortisol-/Ouabaingehaltes in Bezug auf unstimulierte Zellen (ohne Zusatz)	Cortisol		Ouabain	
	Im Zellüberstand	Intrazellulär	Im Zellüberstand	Intrazellulär
<b>Kontrollzellen</b>	1	1	1	1
<b>+ACTH (1<math>\mu</math>M)</b>	4,9	42	1,9	1,63
<b>+Angiotensin II (100nM)</b>	2,3	6,7	Keine Steigerung gegenüber Zellen ohne Zusatz	Keine Steigerung gegenüber Zellen ohne Zusatz
<b>+ACTH (1<math>\mu</math>M) +Angiotensin II (100nM)</b>	5,7 (AII-Anteil: ca. 15,5%)	44,5 (AII-Anteil: ca. 5,95%)	Keine Steigerung gegenüber Zellen ohne Zusatz	Keine Steigerung gegenüber Zellen ohne Zusatz

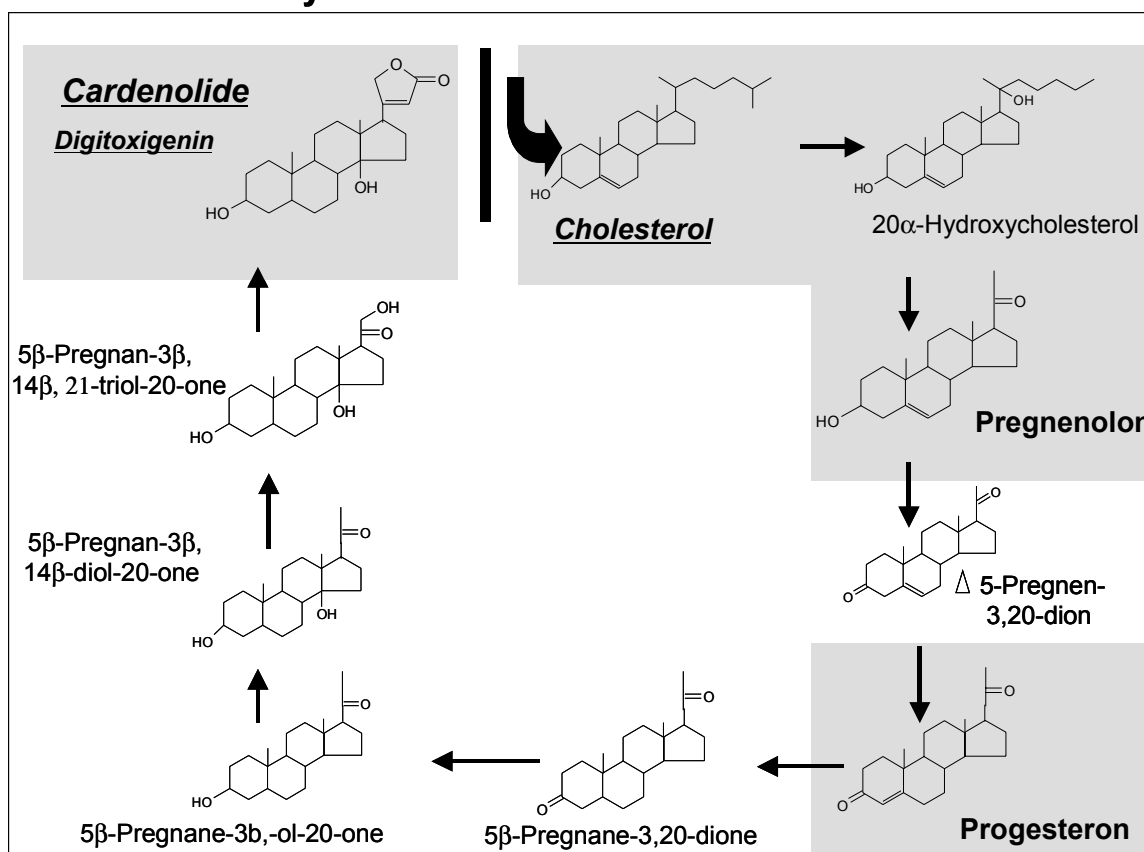
## **7.8.      Pregnenolon und Progesteron: Zwischenstufen in der Biosynthese von Ouabain und Cortisol in NNRZ?**

Der Weg der Biosynthese von Cardenoliden ist in Säugerzellen im Gegensatz zu ihrer Synthese in Pflanzenzellen [1, 3] weitgehend ungeklärt (Abb. 54).

In Nebennierenrindenzellen sind Pregnenolon und Progesteron nach Perrin et al., 1997 [4], mögliche Vorstufen der Biosynthese des endogenen Ouabains aus Cholesterol (Abb. 54). Daher wurde untersucht, ob und bei welchen Konzentrationen die Freisetzung und Biosynthese von Ouabain durch Pregnenolon bzw. Progesteron stimuliert wird. Um das Ausmaß der Effekte von Pregnenolon und Progesteron auf die Ouabainbiosynthese und die Ouabainfreisetzung sicherer beurteilen zu können, wurden beide Parameter im selben Versuchsansatz vergleichend gemessen. Für die Cortisolbiosynthese sind Pregnenolon und Progesteron bekanntermaßen wichtige Zwischenprodukte in der Synthesekette (Abb. 55).

Es wurde daher in den Zellüberständen vergleichend gemessen, ob Pregnenolon und Progesteron auch in kultivierten Nebennierenrindenzellen des Rindes sowohl die Cortisol- als auch die Ouabainfreisetzung beeinflussen. Dazu wurde in Vorversuchen zunächst untersucht, ob die Steroidvorstufen auch die Ouabain- und Cortisolfreisetzung beeinflussen (Kap. 7.8.1 und 7.8.2). Anschließend wurde überprüft, bei welcher Konzentration an Pregnenolon und Progesteron der Biosyntheseweg für Cortisol und Ouabain mit diesen Vorläufermetaboliten ausgelastet ist (Kap. 7.8.3.). Gleichzeitig wurde getestet, welchen Einfluss die zusätzliche Verabreichung von ACTH auf die Biosynthese von Cortisol und Ouabain hat. Bei diesen Untersuchungen wurde auch das direkt wirksame  $\alpha$ -Sympathomimetikum Phenylephrin eingesetzt. Zusätzlich zur Pregnenolon- bzw. Progesteron-stimulierten Abgabe von Cortisol und Ouabain in den Zellüberstand wurde parallel auch deren Konzentration in den Zellen (Kap. 7.8.4.) gemessen.

### Biosynthese von Cardenoliden in Pflanzen



**Abb. 54:**

Die Biosynthese von Cardenoliden in Pflanzen (Stuhlemmer und Kreis [1], 1996, Lichtstein et al., 1998 [3], Gärtner et al., 1994 G[9] und Perrin et al., 1997 [4]). Grau unterlegt: Nachgewiesene Biosynthese-Vorstufen von Cardenoliden in NNRZ in-vitro [50].

### Biosynthese von Corticosteroiden und die daran beteiligten P450-Enzyme

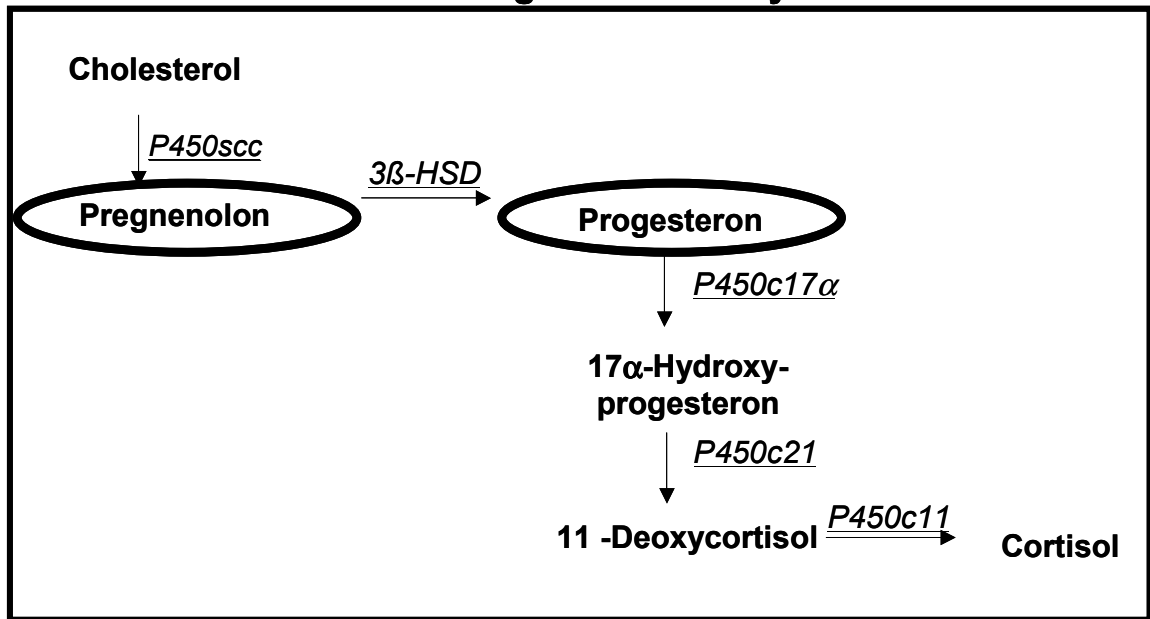


Abb. 55:

Die Biosynthese von Cortisol in NNRZ und die daran beteiligten P450-Enzyme.

<b>3β-HSD:</b>	3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
<b>P450scc:</b>	Cholesterol-20, 22-Desmolase (Side-chain-cleavage-enzyme)
<b>P450c17:</b>	a) Steroid-17α-Hydroxylase b) 17, 20-Lyase
<b>P450c21:</b>	Steroid-21-Hydroxylase
<b>P450c11:</b>	a) Steroid-11β-Hydroxylase b) Steroid-18-Hydroxylase (Corticosteron-Methyl-Oxidase Type I; CMOI)

#### 7.8.1. Wirkung von Pregnenolon und Progesteron auf die ACTH-stimulierte Freisetzung von Cortisol

In orientierenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass Pregnenolon bei einer hohen Konzentration von 100 µM die bereits durch ACTH-stimulierte Cortisolsekretion darüber hinaus sehr deutlich steigert ( $p < 0,001$ ), (Abb. 56). Dagegen blieb 1 µM Pregnenolon ohne Wirkung auf die durch ACTH ausgelöste Stimulation der Cortisolfreisetzung ( $p > 0,05$ ), (Abb. 56).

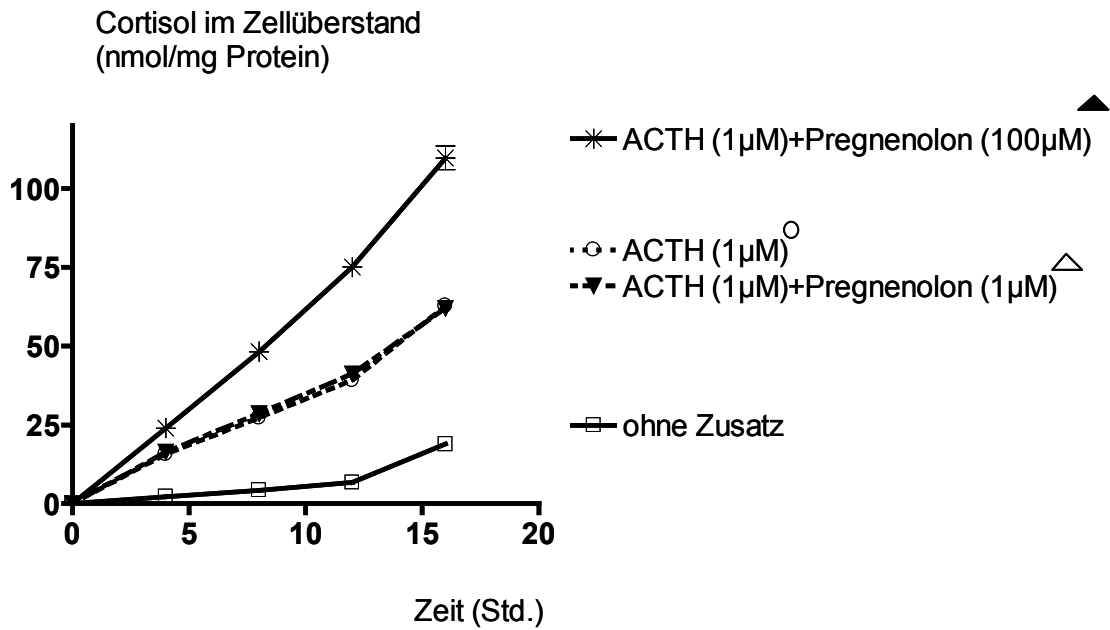


Abb. 56:

**Pregnenolon (100µM) steigert die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase. ( $t_0$  = 16 Stunden nach Präparation).** Nach 4, 8 und 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Pregnenolon in den oben angegebenen Konzentrationen ausgetauscht. (○/▲ :  $p < 0,001$ ; ○/△ :  $p > 0,05$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM; die SEM-Werte liegen in der Größenordnung der Symbole)

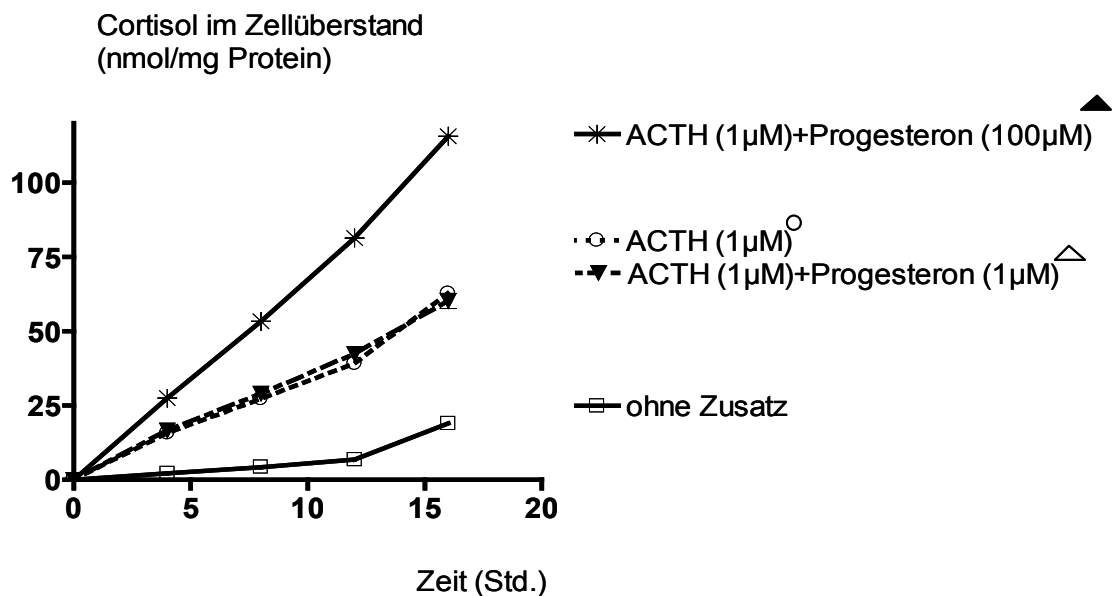


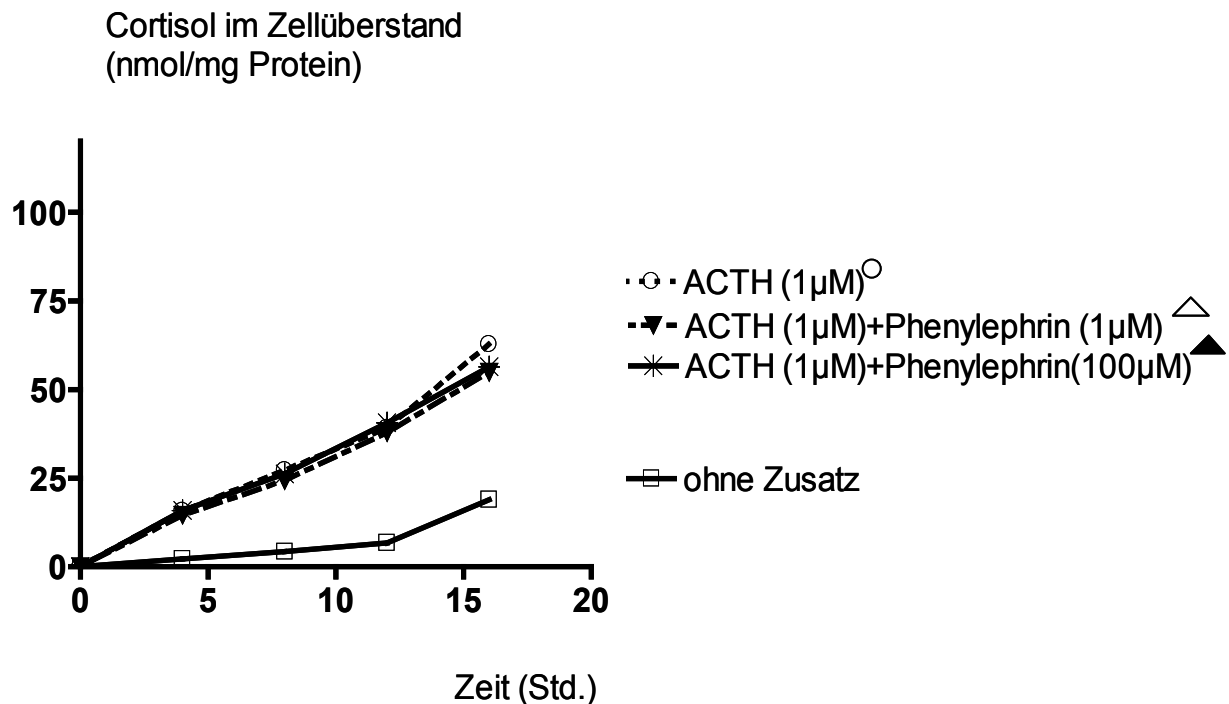
Abb. 57:

**Progesteron (100µM) steigert die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase. ( $t_0$  = 16 Stunden nach Präparation).** Nach 4, 8 und 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Progesteron in den oben angegebenen Konzentrationen ausgetauscht. (○/▲ :  $p < 0,001$ ; ○/△ :  $p > 0,05$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM ; die SEM-Werte liegen in der Größenordnung der Symbole).



100  $\mu\text{M}$  Progesteron erhöhte die stimulierende Wirkung des ACTH auf die Cortisolsekretion signifikant  $p < 0,001$  (Abb. 57). Die Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Progesteron hatte ebenso wie Pregnenolon (1  $\mu\text{M}$ ) keine Wirkung auf die ACTH-Stimulierung,  $p > 0,05$  (Abb. 56).

Phenylephrin (1  $\mu\text{M}$ ) zeigte keine additive Wirkung auf die ACTH-Stimulierung der Cortisolsynthese (Abb. 58).



**Abb. 58:**

**Phenylephrin hat keinen Effekt auf die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase. ( $t_0$  = 16 Stunden nach Präparation).**

Nach 4, 8 und 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Phenylephrin in den angegebenen Konzentrationen ausgetauscht. ( $\circ/\blacktriangle$ :  $p > 0,05$ ;  $\circ/\triangle$ :  $p > 0,05$ ;  $n=4$ ;  $\pm\text{SEM}$ ; die SEM-Werte liegen in der Größenordnung der Symbole).

Phenylephrin zeigte weder auf die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion (Abb. 58) noch auf die ACTH-stimulierte Ouabainfreisetzung eine additiv stimulierende Wirkung (Abb. 59).

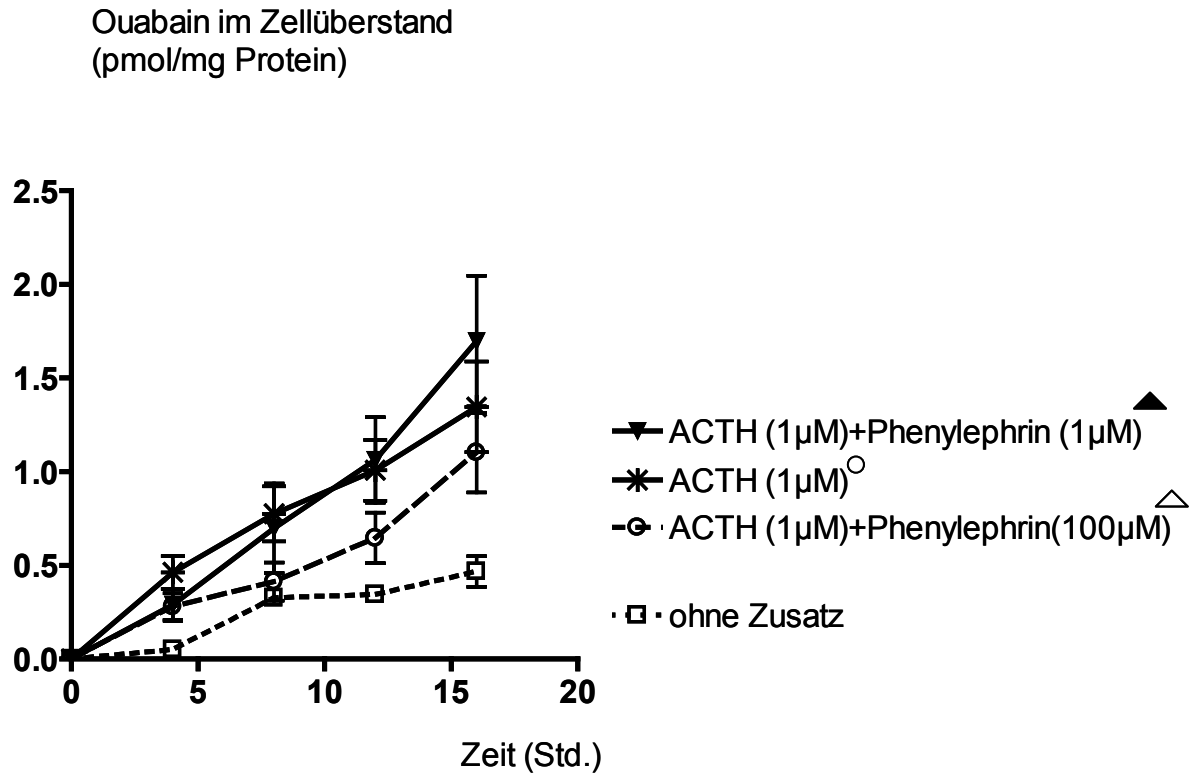


Abb. 59:

**Phenylephrin hat keinen Effekt auf die ACTH-stimulierte Ouabainfreisetzung. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase. ( $t_0 = 16$  Stunden nach Präparation).** Nach 4, 8 und 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Phenylephrin in den angegebenen Konzentrationen ausgetauscht.

(○/▲ :  $p > 0,05$ ; ○/△ :  $p > 0,05$ ;  $n = 4$ ;  $\pm$ SEM)

### 7.8.2. Wirkung von Pregnenolon und Progesteron auf die ACTH-stimulierte Freisetzung von Ouabain

Ebenso wie die hohe Konzentration von 100  $\mu$ M Pregnenolon die Cortisolsynthese und -sekretion erhöhte, steigerte es auch die Freisetzung von Ouabain aus ACTH-stimulierten Nebennierenrindenzellen von Rindern in Kultur deutlich ( $p < 0,001$ ), (Abb. 60). Die niedrige Pregnenolon-Konzentration von 1  $\mu$ M war wiederum ohne Effekt auf die Ouabainfreisetzung.

Progesteron zeigte eine sehr ähnliche Wirkung auf die Cortisol- und Ouabainfreisetzung: Mit 100  $\mu$ M Dosis löste Progesteron eine deutliche Steigerung der ACTH-stimulierten Ouabainfreisetzung aus Rinder-Nebennierenrindenzellen in Kultur aus ( $p < 0,001$ ), (Abb. 61). Die 1  $\mu$ M Dosis des Progesterons blieb wirkungslos.

Ouabain im Zellüberstand  
(pmol/mg Protein)

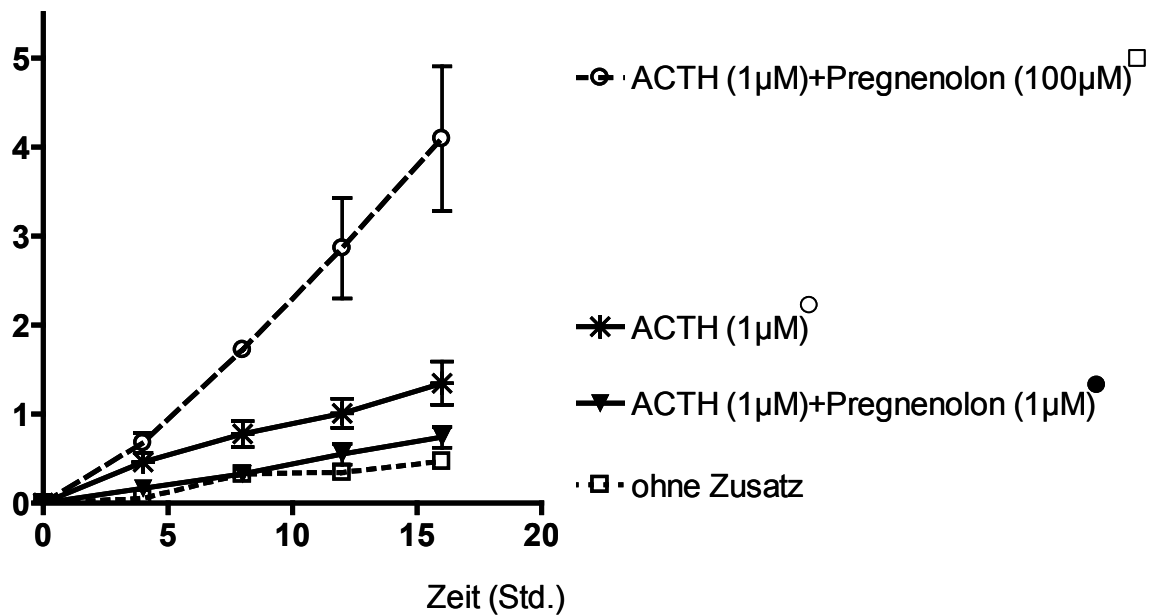


Abb. 60

**Pregnenolon (100μM) steigert die ACTH-stimulierte Ouabainfreisetzung. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase. ( $t_0$  = 16 Stunden nach Präparation).** Nach 4, 8 und 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH (1μM) bzw. Pregnenolon, (1μM bzw. 100μM) ausgetauscht. (○/□:  $p < 0,001$ ; ○/●:  $p > 0,05$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)

Ouabain im Zellüberstand  
(pmol/mg Protein)

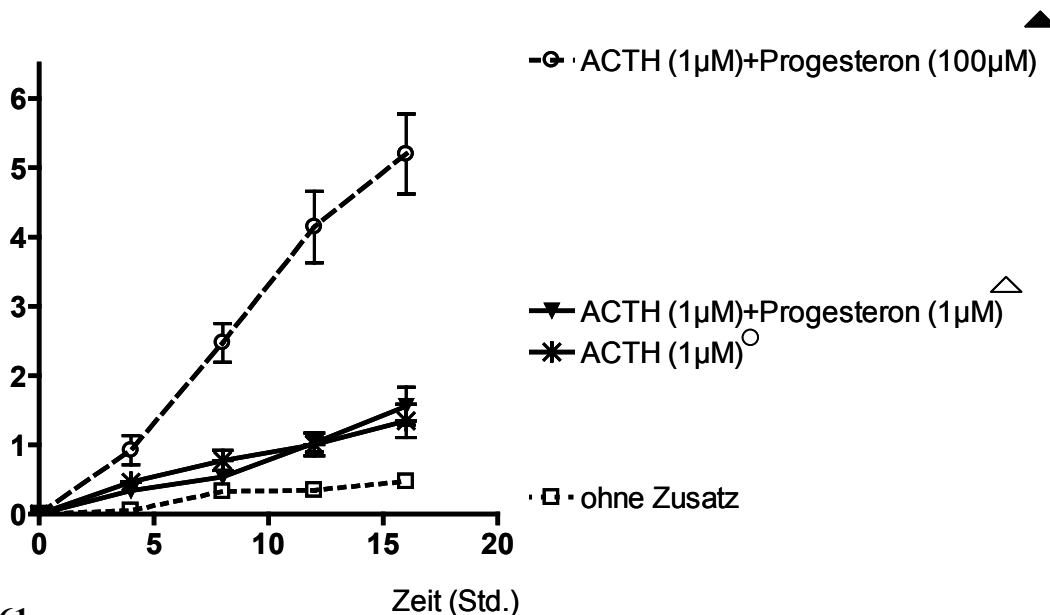


Abb. 61:

**Progesteron (100μM) steigert die ACTH-stimulierte Ouabainfreisetzung. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur während einer 16-stündigen Inkubationsphase. ( $t_0$  = 16 Stunden nach Präparation).** Nach 4, 8 und 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Progesteron in den angegebenen Konzentrationen ausgetauscht. (○/ ▲:  $p < 0,001$ ; ○/ △:  $p > 0,05$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)

### **7.8.3. Konzentrationsabhängigkeit, Sättigung und ACTH-Einfluss der stimulierenden Wirkung von Pregnenolon und Progesteron auf die *Freisetzung* von Cortisol und Ouabain**

Da eine Stimulierung der Freisetzung von Cortisol und Ouabain durch 100  $\mu\text{M}$ , aber nicht durch 1  $\mu\text{M}$  Pregnenolon bzw. Progesteron zustande kam (Kap. 7.8.2.), interessierten uns folgende Fragen:

- In welchem Konzentrationsbereich an Pregnenolon bzw. Progesteron werden stimulierende Effekte auf die Ouabain- und die Cortisolfreisetzung beobachtet?
- Gibt es eine Sättigung an Pregnenolon bzw. Progesteron, ab der die Ouabain- bzw. Cortisolfreisetzung nicht weiter gesteigert werden kann?
- Welchen Einfluss hat die zusätzliche Verabreichung von ACTH auf die Wirkung, die Pregnenolon bzw. Progesteron auf den Cortisol- bzw. Ouabain-Haushalt ausüben?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Nebennierenrindenzellen des Rindes mit verschiedenen Konzentrationen an Pregnenolon und Progesteron (nach 16-stündiger Aequilibrierungsphase) für 4 Stunden inkubiert. In jeweils parallelen Ansätzen wurde zusätzlich ACTH zugegeben.

Abbildung 62 zeigt die Pregnenolon-Abhängigkeit der Steigerung der Cortisolsekretion. Der Kurvenverlauf entspricht einer klassischen Sättigungskurve.

ACTH löste nur in Abwesenheit von Pregnenolon (★ in Abb. 62) oder Progesteron (Abb. 64) eine geringgradige, jedoch nicht signifikant stimulierende Wirkung ( $p=0,125$ ) auf die Cortisolsekretion aus, was sich durch den parallelen Verlauf der Kurven mit bzw. ohne ACTH-Zugabe zeigt ( $p=0,25$ ). Der mit ★ gekennzeichnete Bereich gibt das Verhältnis von unstimulierten Zellen zu Zellen wieder, denen ACTH zugegeben worden war (Abb. 62) und zwar in Abwesenheit des Substrates Pregnenolon.

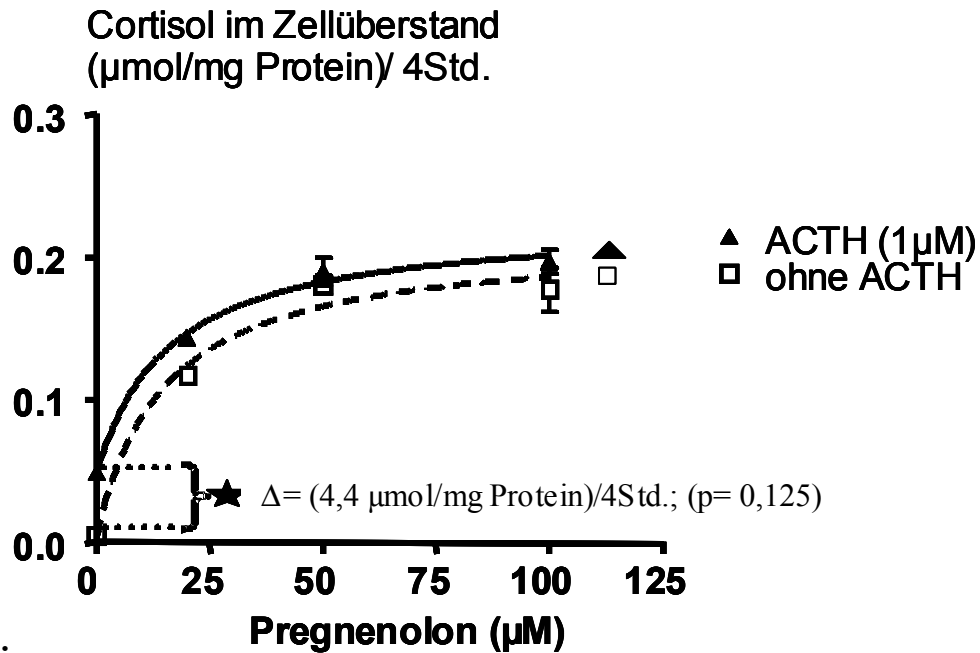


Abb. 62:

Pregnenolon stimuliert die Cortisolsekretion; ACTH wirkt ausschließlich in Abwesenheit von Pregnenolon stimulierend auf die Cortisolsekretion (vgl. ★ Markierung). Messung an Rinder-NNRZ nach 4 Stunden Inkubation mit Pregnenolon bzw. ACTH und vorheriger 16-stündiger Aequilibrierungsphase. Die Kurvenanpassungen wurden mit den in Kap. 6.1 beschriebenen Gleichungen 1 und 2 ermittelt. (▲/□:  $p=0,25$ ;  $n=4$ ;  $\pm\text{SEM}$ )

Ouabain im Zellüberstand  
( $\text{pmol}/\text{mg Protein}$ )/4 Std.

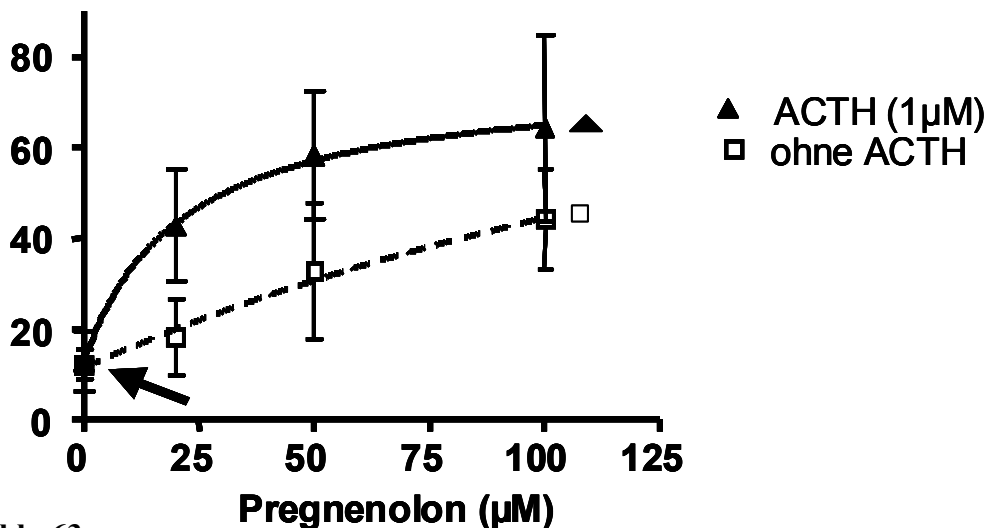


Abb. 63:

Pregnenolon stimuliert die Ouabainfreisetzung; ACTH übt nur in Kombination mit Pregnenolon im Kulturmedium eine zusätzlich stimulierende Wirkung aus, hat aber in Abwesenheit von Pregnenolon keinen Effekt auf die Ouabainfreisetzung (Pfeilmarkierung). Messung an Rinder-NNRZ nach 4 Stunden Inkubation mit Progesteron bzw. ACTH und vorheriger 16-stündiger Aequilibrierungsphase. Die Kurvenanpassung wurde mit den im Kap. 6.1 beschriebenen Gleichungen 1 und 2 ermittelt. (▲/□:  $p=0,625$ ;  $n=4$ ;  $\pm\text{SEM}$ )

Ebenso wie beim Studium der Wirkung von ACTH auf die Pregnenolon-stimulierte Cortisolsekretion (Abb. 62) zeigte Pregnenolon einen deutlich stimulierenden Effekt auch auf die Ouabainfreisetzung (Abb. 63). ACTH zeigte in Abwesenheit von Pregnenolon (Pfeilmarkierung in Abb. 63) keinen Effekt auf die Ouabainsekretion ( $p=0,625$ ), steigerte allerdings die Pregnenolon-stimulierte Ouabainfreisetzung zusätzlich geringgradig (Abb. 63). Diese Daten der Pregnenolon-Wirkung auf die Freisetzung von Cortisol und Ouabain sind in der Tabelle 15a zusammengefasst.

**Tab. 15a:  $V_{\max}$  - und  $K_S$ -Wert-Bestimmung für die durch Pregnenolon und ACTH ausgelöste Freisetzung von Cortisol und Ouabain.**

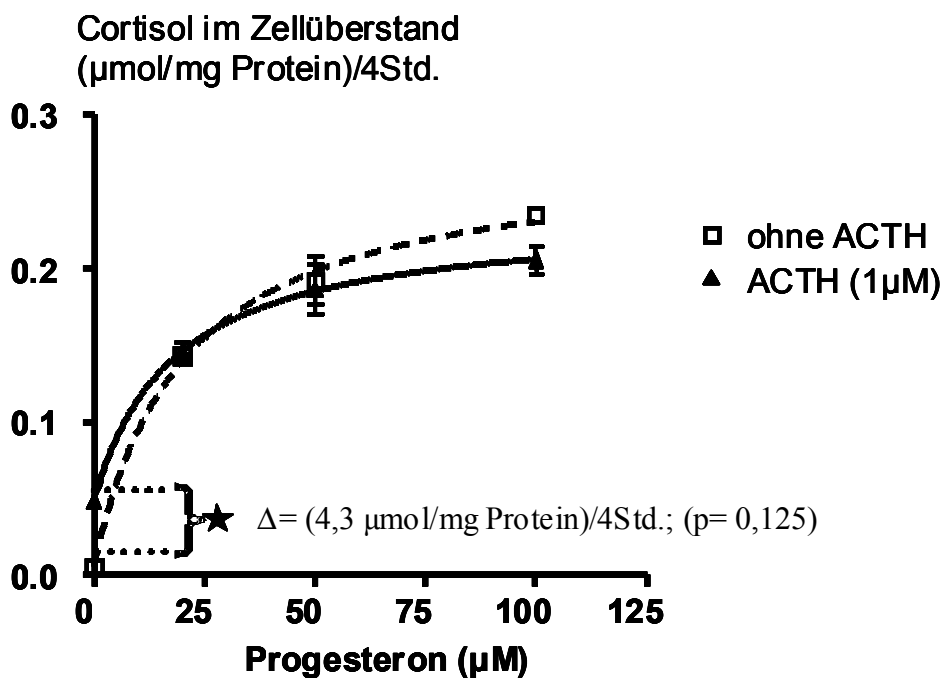
<b><u>Cortisol</u></b>	<b><math>V_{\max}</math> [<math>\mu\text{mol}/\text{mg Protein} \times 4\text{Std}^{-1}</math>]</b>	<b><math>K_S</math>-Wert [<math>\mu\text{M}</math>]</b>
<b>Pregnenolon</b>	20,920	14,890
<b>Pregnenolon + ACTH</b>	17,750	16,040
<b><u>Ouabain</u></b>	<b><math>V_{\max}</math> [<math>\text{pmol}/\text{mg Protein} \times 4\text{Std}^{-1}</math>]</b>	<b><math>K_S</math>-Wert [<math>\mu\text{M}</math>]</b>
<b>Pregnenolon</b>	115,50	249,80
<b>Pregnenolon + ACTH</b>	63,160	21,490

Die Daten aus den Abbildungen 62 und 63, in Tabelle 15a zusammengefasst, zeigen, dass sich außerdem sowohl für den Cortisol-Transport als auch für den Ouabain-Transport ein  $K_S$ -Wert (Substratkonstante) und ein  $V_{\max}$ -Wert bestimmen lassen. Der  $K_S$ -Wert gibt hierbei die Substratkonzentration an Pregnenolon bzw. Progesteron an, bei der die Ouabain- bzw. Cortisolfreisetzung halbmaximal ist. Es zeigt sich, dass die Ouabainfreisetzung im Zeitraum von 4 Stunden eine 16-fach höhere Pregnenolonkonzentration benötigt im Vergleich zur Cortisolfreisetzung, um 50 % der maximalen Sekretionsrate zu erreichen. In Gegenwart von ACTH sind dagegen beide Hormonsysteme bei der gleichen Pregnenolonkonzentration halbmaximal gesättigt.

Aufgrund dieser Sättigung kann man davon ausgehen, dass der Freisetzung von Ouabain bzw. Cortisol ein Carrier-vermittelter Transport zu Grunde liegt.

Auffällig ist, dass die  $K_S$ -Werte für Ouabain und Cortisol, die die Pregnenolon-Aufnahme, verknüpft mit der Steroid-Biosynthese und der Freisetzung beider Steroid-Hormone beinhalten, im gleichen Konzentrationsbereich liegen. Es ist auch eindeutig, dass die Kapazität für die Ouabainsynthese und –freisetzung ca. 180 mal niedriger liegt als die der Cortisolsynthese.

Auch Progesteron stimulierte die Cortisolsekretion im gleichen Konzentrationsbereich wie Pregnenolon (Abb. 64), und auch hier war die Cortisolsynthese ab  $100\mu\text{M}$  Progesteron gesättigt. Die sich überschneidenden Linien zeigen aber, dass ACTH keine zusätzliche Wirkung zu der des Progesterons ausübt. (Abb. 64). In Abwesenheit von Progesteron, Abb. 64 Markierung, wie auch von Pregnenolon, Abb. 62 Markierung, zeigte ACTH allerdings eine Stimulation der Cortisolsekretion.



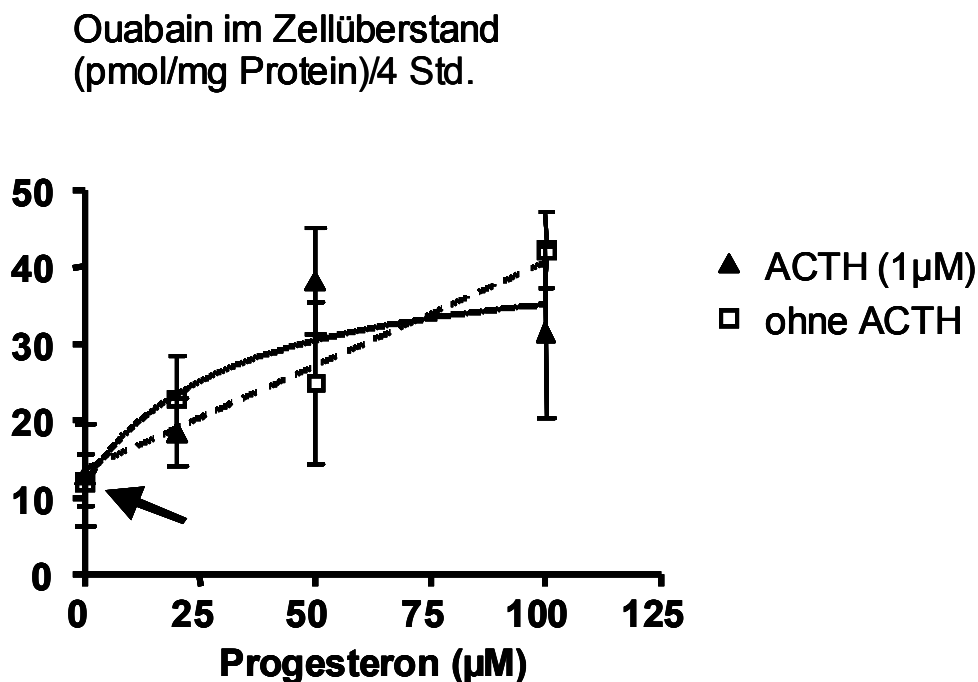
**Abb. 64:**

**Progesteron stimuliert die Cortisolsekretion; ACTH übt nur in Abwesenheit von Progesteron einen stimulierenden Effekt auf die Cortisolsekretion aus (vgl. Markierung★).** Messung an Rinder-NNRZ nach 4-stündiger Inkubation mit Progesteron bzw. ACTH und vorheriger 16-stündiger Aequilibrierungsphase. Die Kurvenanpassung wurde mit den in Kap. 6.1 beschriebenen Gleichungen 1 und 2 ermittelt. ( $n=4$ ;  $\pm\text{SEM}$ )

Progesteron steigerte auch die Ouabainfreisetzung aus Nebennierenrindenzellen von Rindern deutlich (Abb. 65). ACTH hatte jedoch weder in Abwesenheit (Abb. 65 Pfeilmarkierung) noch in Gegenwart steigender Konzentrationen an Progesteron eine stimulierende Wirkung.

Ein Vergleich der Abb. 63 mit Abb. 65 zeigt, dass ACTH die Biosynthese und Freisetzung von Ouabain aus Pregnenolon (Abb. 63) geringgradig stimuliert, nicht aber aus Progesteron (Abb. 65).

Die fehlende, stimulierende Wirkung von ACTH auf die Freisetzung von Cortisol bzw. Ouabain (Abb. 62-65) steht in einem scheinbaren Widerspruch zu den Daten in Kapitel 7.7.5, Tabelle 14. Die dort vorgestellten Untersuchungen beruhen allerdings auf einer Inkubationsphase von 72 Stunden, die hier gezeigten Ergebnisse (Abb. 62-65) jedoch auf einer Inkubationsphase von nur 4 Stunden. Daher sind die hier (Abb. 62-65) gemessenen Effekte deutlich schwächer ausgeprägt als sie in Kapitel 7.7.5 geschildert wurden.



**Abb. 65:**

**Progesteron steigert die Ouabainfreisetzung; ACTH übt keinen stimulierenden Effekt auf die Cortisolsekretion aus. Auch in Abwesenheit von Progesteron zeigt ACTH keinen Effekt auf die Ouabainfreisetzung (Pfeilmarkierung).** Messung an Rinder-NNRZ nach 4 Stunden Inkubation mit Progesteron bzw. ACTH und vorheriger 16-stündiger Aequilibrierungsphase. Die Kurvenanpassung wurde mit den in Kap. 6.1 beschriebenen Gleichungen 1 und 2 n ermittelt. (n=4;  $\pm$ SEM)

In Tabelle 15b sind die Effekte des Progesterons auf die maximale Sekretionsgeschwindigkeit von Cortisol und Ouabain noch einmal zusammengefasst. Es zeigt sich, dass die



halbmaximale Sättigung beider Steroidsekretionen bei einer durchschnittlichen Konzentration von 24  $\mu\text{M}$  Progesteron erreicht wird.

Aus dem Vergleich der Daten in Tabelle 15a und 15b ergibt sich, dass die Synthese von Cortisol aus den Vorläufern Pregnenolon und Progesteron etwa um den Faktor 300.000 bis 900.000 stärker ist als die des Ouabains.

**Tab. 15b:  $V_{\max}$  - und  $K_S$ -Wert-Bestimmung für die durch Progesteron und ACTH ausgelöste Freisetzung von Cortisol und Ouabain.**

<b><u>Cortisol</u></b>	<b><math>V_{\max}</math> [<math>\mu\text{mol}/\text{mg Protein} \times 4\text{Std}^{-1}</math>]</b>	<b><math>K_S</math>-Wert [<math>\mu\text{M}</math>]</b>
<b>Progesteron</b>	27,080	20,440
<b>Progesteron + ACTH</b>	18,590	18,110
<b><u>Ouabain</u></b>	<b><math>V_{\max}</math> [<math>\text{pmol}/\text{mg Protein} \times 4\text{Std}^{-1}</math>]</b>	<b><math>K_S</math>-Wert [<math>\mu\text{M}</math>]</b>
<b>Progesteron</b>	Nicht auswertbar	Nicht auswertbar
<b>Progesteron + ACTH</b>	31,080	33,940

#### 7.8.4. Wirkung von Pregnenolon und Progesteron auf die Biosynthese von Cortisol und Ouabain

Eingangs wurde berichtet, dass Pregnenolon und Progesteron als Substrate für die Cortisol- und die Ouabainbiosynthese dienen. Da in vorangegangenen Versuchen die Freisetzung von Cortisol und Ouabain in das Zellkulturmedium gemessen wurde, untersuchten wir nun die Biosynthese und prüften, ob sich die intrazellulären Konzentrationen von Cortisol und Ouabain in Gegenwart der Vorläufer-Substrate Pregnenolon und Progesteron verändern.

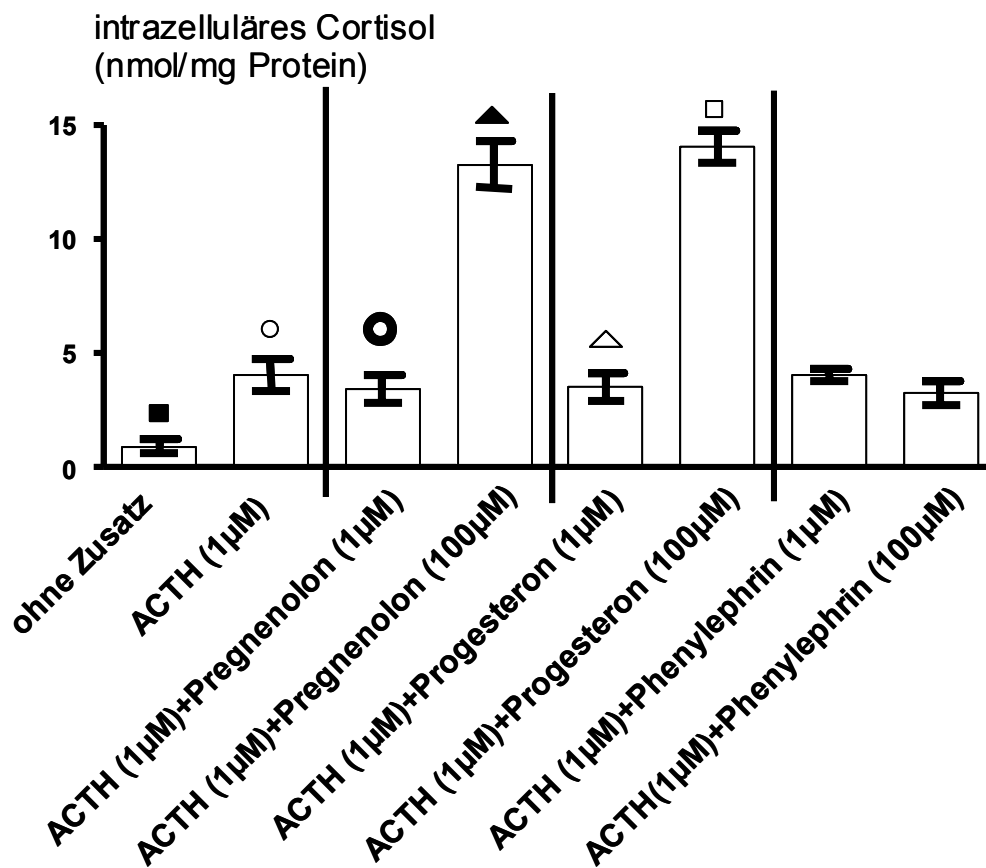


Abb. 66:

**Intrazellulärer Cortisolgehalt am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und danach weiter anschließender 16-stündiger Inkubationsphase mit ACTH, Pregnenolon, Progesteron und Phenylephrin an Rinder-NNRZ in Kultur.** Nach 4, 8 und 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellüberstände vollständig gegen frisches Medium inklusive ACTH bzw. Pregnenolon, Progesteron und Phenylephrin in den oben angegebenen Konzentrationen ausgetauscht. Die Messung des intrazellulären Cortisolgehaltes erfolgte am Ende der insgesamt 16-stündigen Inkubationsphase. (■/○:  $p < 0,01$ ; ○/●:  $p > 0,05$ ; ○/▲:  $p < 0,001$ ; ○/△:  $p > 0,05$ ; ○/□:  $p < 0,001$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)

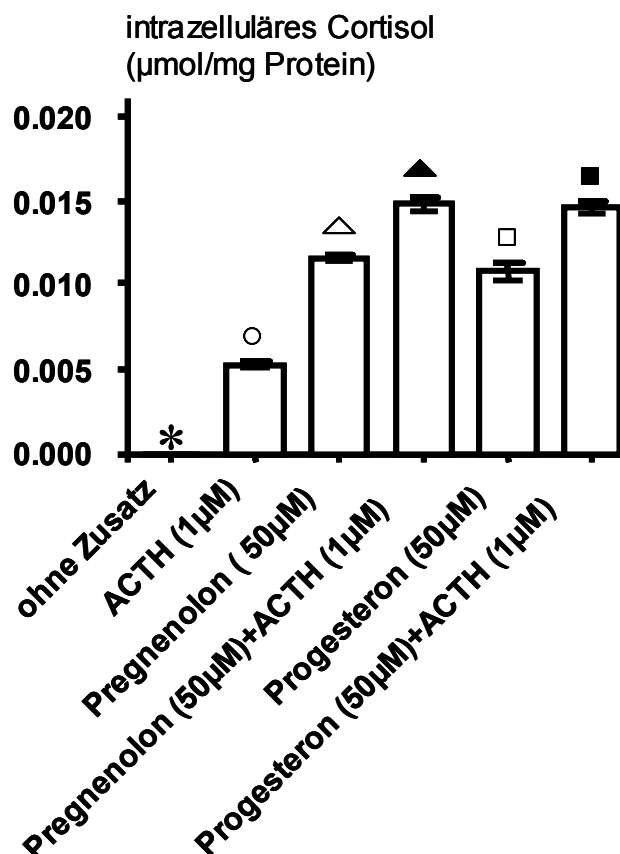
Abbildung 66 zeigt, dass die Inkubation der Nebennierenrindenzellen mit sättigenden Konzentrationen (100µM) an Pregnenolon und Progesteron zu einer deutlichen Erhöhung der

intrazellulären Cortisolkonzentrationen führt ( $p < 0,001$ ). Diese Stimulierung wird auch in Abwesenheit des ACTH beobachtet (Abb. 67). ACTH ( $1\mu\text{M}$ ) führt somit bereits in Abwesenheit von extrazellulären Steroidsubstraten (Abb. 67) zu einer deutlichen Steigerung der Cortisolsynthese ( $p < 0,001$ ).

Die im Bereich des  $K_s$  –Wertes an Progesteron und Pregnenolon beobachtbare ACTH-Stimulierung liegt im gleichen Größenbereich wie die ohne Vorläufersubstrat (Abb. 67).

Hieraus ist zu schließen, dass ACTH einen Schritt in der Biosynthese des Cortisols stimuliert, aber nicht die Aufnahme der Steroidvorläufersubstrate Pregnenolon bzw. Progesteron beeinflusst. Beide Effekte (ACTH und Pregnenolon/Progesteron) verhalten sich hierbei nicht additiv und beeinflussen sich nicht gegenseitig.

Da ACTH über die Erhöhung von intrazellulärem cAMP wirkt, ist interessant, dass Phenylephrin jedoch keinen Effekt auf die Cortisolsynthese hat (Abb. 66) [213, 214]. Dies bedeutet, dass nur der ACTH-vermittelte cAMP-Signalweg, nicht aber eine über IP3-vermittelte Signalkaskade beteiligt ist.

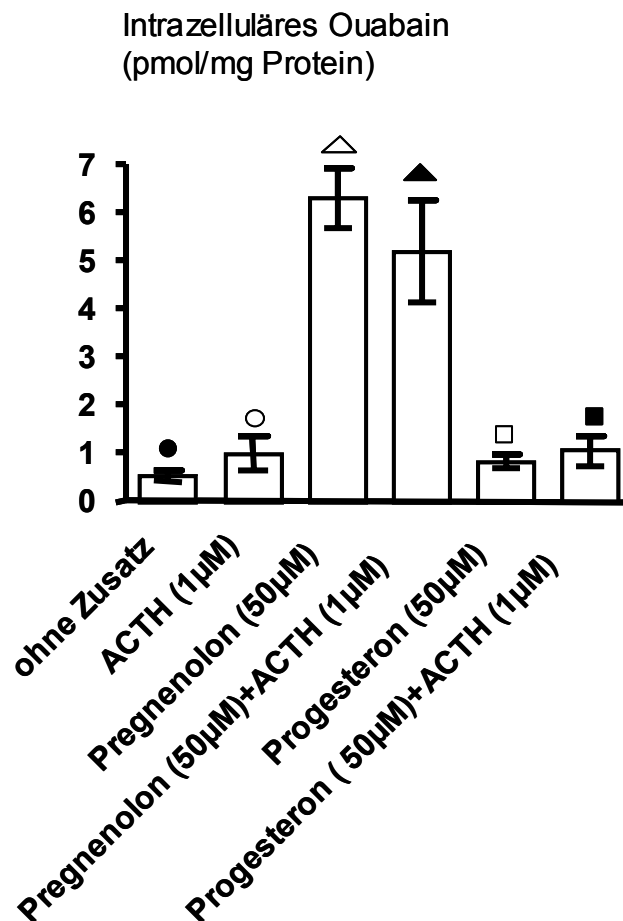


**Abb. 67:**

**Intrazellulärer Cortisolgehalt am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH, Pregnenolon und Progesteron an Rinder-NNRZ in Kultur.** (△ / ▲ :  $p < 0,001$ ; □ / ■ :  $p < 0,001$ ; △ / □ :  $p > 0,05$ ; □ / ■ :  $p > 0,05$ ;  $n=8$ ;  $\pm\text{SEM}$ )

(\* = nicht darstellbarer Minimalgehalt)

Das Studium des Einflusses von ACTH und Steroid-Vorläufersubstraten auf die intrazelluläre Ouabainkonzentration (Abb. 68) zeigte ein vom intrazellulären Cortisol unterschiedliches Verhalten: ACTH führte nur zu einer geringgradigen, nicht signifikanten Erhöhung des intrazellulären Ouabaingehaltes (Abb. 68),  $p > 0,05$ . Gleiches galt für Progesteron ( $50\mu\text{M}$ ) und auch für die kombinierte Anwendung von Progesteron und ACTH ( $p > 0,05$ ). Pregnenolon ( $50\mu\text{M}$ ) hingegen löste eine deutliche Erhöhung des intrazellulären Ouabaingehaltes aus, verglichen mit unbehandelten Zellen und mit ACTH- oder Progesteron-behandelten Zellen (es gilt jeweils:  $p < 0,001$ ). In der Kombination mit Pregnenolon zeigte ACTH ebenso wenig einen zusätzlichen Effekt wie in der Kombination mit Progesteron.



**Abb. 68:**  
Intrazellulärer Ouabaingehalt am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH, Pregnenolon und Progesteron an Rinder-NNRZ in Kultur.  
(●/○:  $p > 0,05$ ; ●/△:  $p < 0,001$ ; ●/□:  $p > 0,05$ ; ○/▲:  $p < 0,01$ ; △/▲:  $p > 0,05$ ; △/□:  $p < 0,001$ ; ▲/■:  $p > 0,05$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)

## **7.9. Corticosteron, Aldosteron, Digoxin, Digitoxigenin und Ouabain als Biosynthesevorstufen von Ouabain bzw. Cortisol**

Da die Hormone Pregnenolon und Progesteron *in-vitro* nur in hohen Konzentrationen Steroidssubstrate der Biosynthese von Ouabain und Cortisol waren, ist es vorstellbar, dass die Nebennierenhormone Corticosteron und Aldosteron bzw. auch Cardenolide wie Digitoxigenin und Digoxin ebenfalls Ausgangssubstrate für die Ouabainsynthese sein könnten. Gleichzeitig wurde deren Wirkung sowie auch die des Ouabains selbst auf die Cortisolfreisetzung und -biosynthese gemessen.

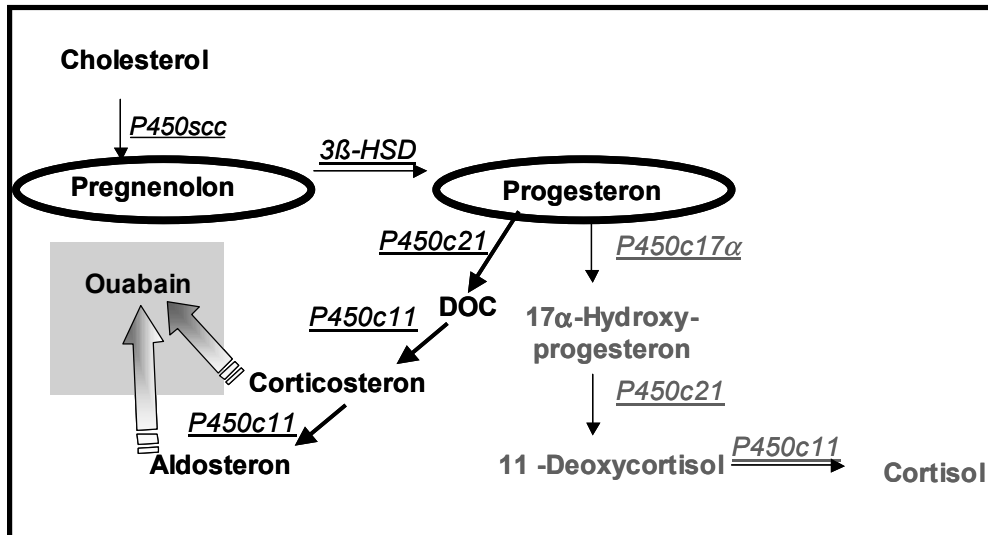
### **7.9.1. Cortisol- und Ouabainfreisetzung und -biosynthese unter Corticosteron, Aldosteron und Metyrapon**

Ebenso wie Ouabain und Cortisol wird auch Aldosteron über die Vorstufen Pregnenolon und Progesteron synthetisiert (Abb. 69). Ouabain und Aldosteron werden außerdem von Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde produziert und ihre Regulation wird z.T. von gemeinsamen Substanzen beeinflusst [164]. Aus diesem Grunde wurde die Ouabainsynthese unter Corticosteron bzw. Aldosteron untersucht (Abb. 69).

Die Biosynthesewege von Aldosteron, Corticosteron und Cortisol sind aus Abbildung 69 ersichtlich. Metyrapon ist ein spezifischer Hemmstoff der P450-Enzyme, die eine 11 $\beta$ -Hydroxylierung ausführen (Abb. 70). Die Substanz wird in der Medizin zur Funktionsprüfung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse verwendet (Metyrapon-Test), da sie die Bildung von Cortisol und Aldosteron unterdrückt [215]. Diese 11 $\beta$ -Hydroxylierung ist damit ein wichtiger Schritt bei der Biosynthese von Cortisol, Aldosteron und Corticosteron [63]. Falls Ouabain über eine 11- $\beta$ -Hydroxygruppe verfügt, wie die Arbeitsgruppe Hamlyn behauptet (vgl. Kap. 2.1.2.1), müssten isolierte Nebennierenzellen unter Metyrapon auch in ihrer Ouabainsynthese behindert werden. Hamlyn et. al [63] fand unter Metyrapon eine Hemmung der Angiotensin-stimulierten Ouabain- und Aldosteronsynthese. Falls Ouabain jedoch eine 11 $\alpha$ -Hydroxygruppe enthält [13], wovon Schneider et al. ausgehen, dann sollte Metyrapon keinen hemmenden Effekt auf die Ouabainproduktion haben. Metyrapon wurde

daher eingesetzt, um auf der Grundlage von Hamlyn et al. 2003 [63] (s.o.) die Frage nach dem in Rindern vorkommenden Ouabain-Isomer zu beantworten.

### Hypothetische Biosynthese von Ouabain aus Corticosteroiden und Aldosteron und die daran beteiligten P450-Enzyme



**Abb. 69: Die Hypothetische Biosynthese von Ouabain aus Corticosteroiden und Aldosteron und die daran beteiligten P450-Enzymen.** Hervorgehoben: Hypothetische Verbindung des Aldosteron-Biosyntheseweges mit dem des endogenen Ouabains (modifiziert nach New, M.I., 1998 [176]). (Abb. 69 stellt eine Erweiterung von Abb. 55 dar).

- 3β-HSD:** 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase  
**P450scc:** Cholesterol-20, 22-Desmolase (Side-chain-cleavage-enzyme)  
**P450c17:** a) Steroid-17α-Hydroxylase  
 b) 17, 20-Lyase  
**P450c21:** Steroid-21-Hydroxylase  
**P450c11:** a) Steroid-11β-Hydroxylase  
 b) Steroid-18-Hydroxylase (Corticosteron-Methyl-Oxidase Type I; CMOI)  
**DOC:** Deoxycortisol

Da Corticosteron und Aldosteron bereits über eine Hydroxylierung in 11β-Position verfügen, sollte Metyrapon die Cortisol- bzw. die Ouabainfreisetzung nicht beeinflussen, falls sie Vorläufer in der Synthesekette dieser beiden Steroide sind. Die Effekte des Corticosterons, des Aldosterons und des Metyrapons wurden vergleichend für die Cortisol- und die Ouabainbiosynthese gemessen.

In den Untersuchungen der Abbildungen 71-74 wurden die Rinder-Nebennierenrindenzellen 16 Stunden zwecks Anpassung aequilibriert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 4

Stunden hinweg mit Corticosteron, Aldosteron bzw. Metyrapon und zwar in den jeweils in Abb. 71-74 angegebenen Konzentrationen bzw. Kombinationen.

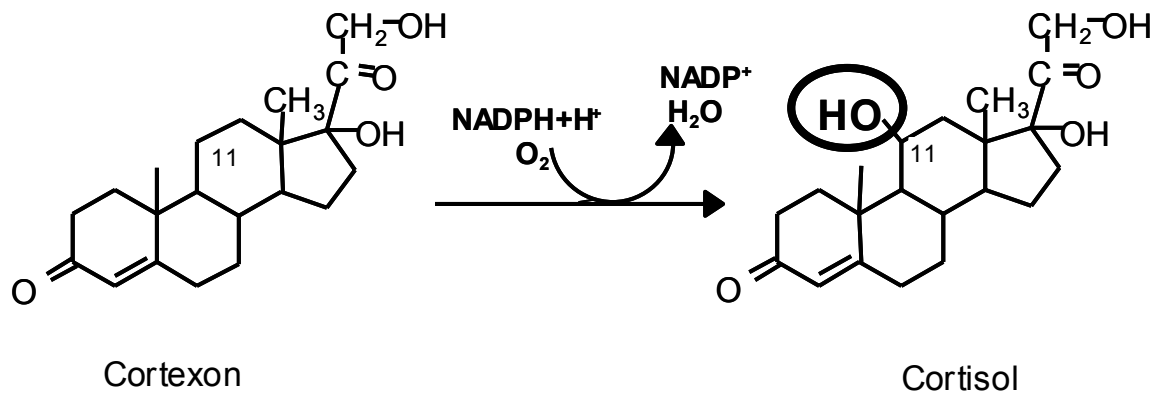


Abb. 70: Metyrapon ist ein Hemmstoff der 11 $\beta$ -Hydroxylase (Hamlyn et al., 2003 [63])

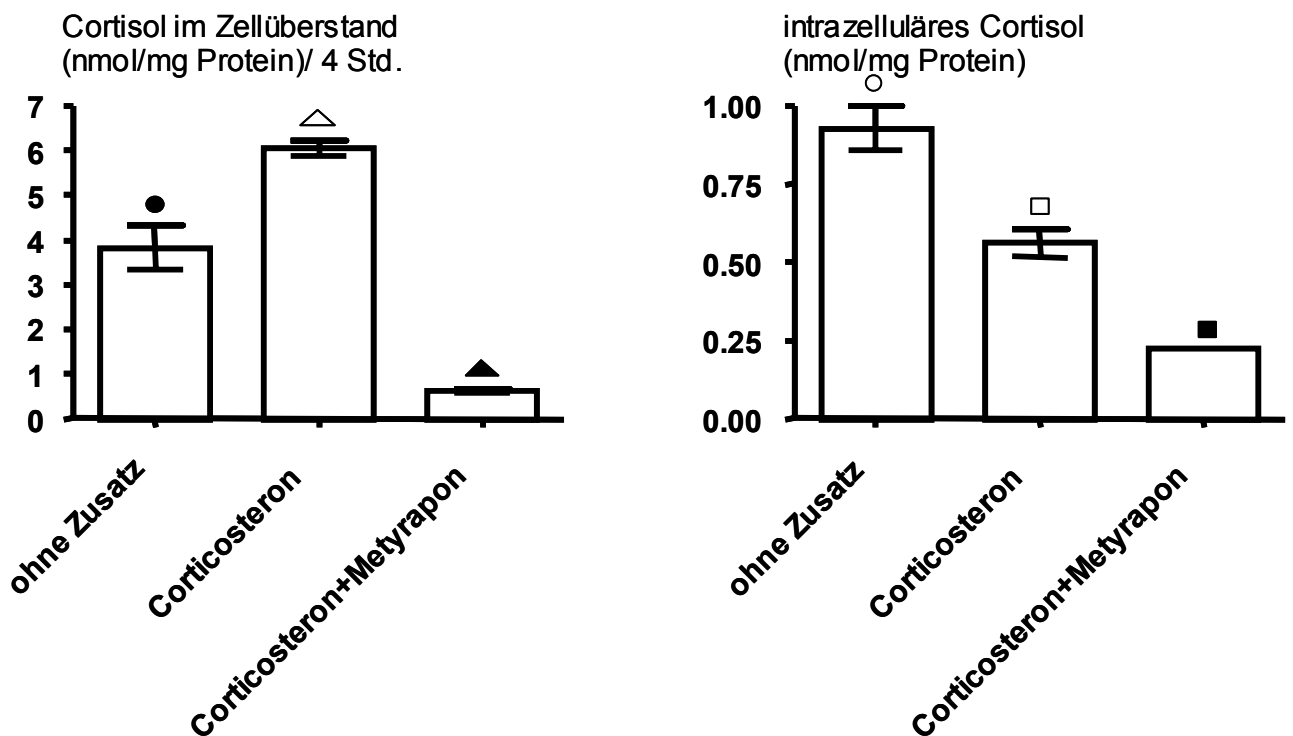


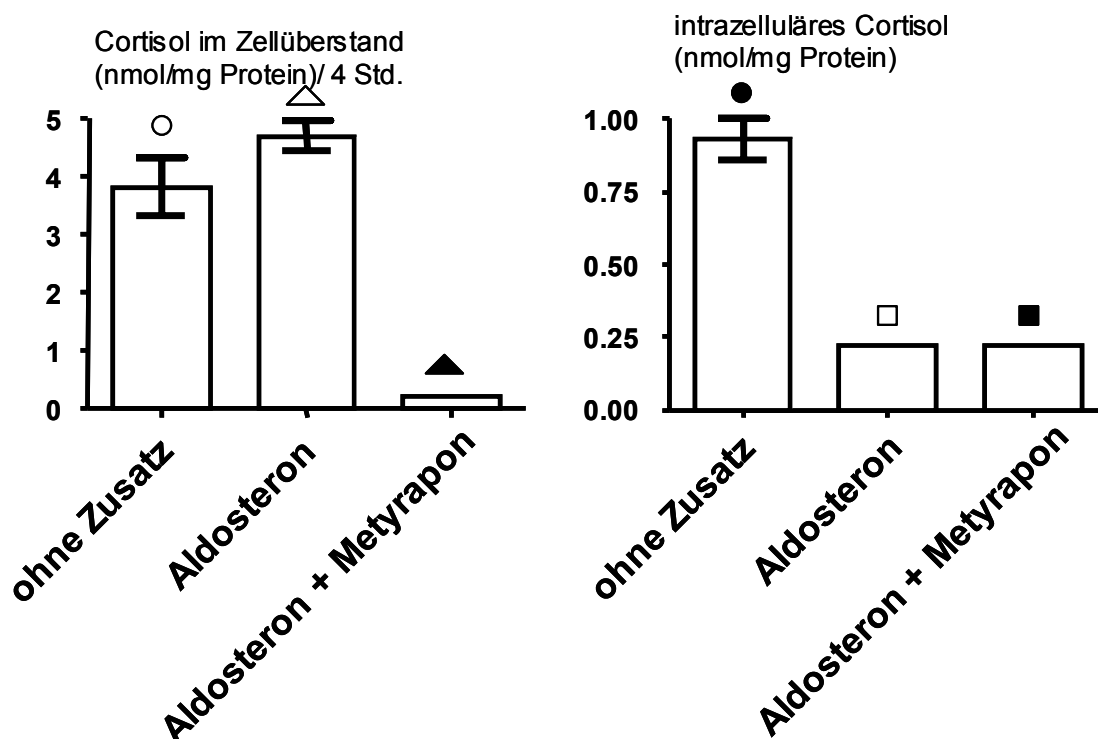
Abb. 71 a, b:

**Effekt von Metyrapon auf die Cortisolkonzentration im Zellüberstand (a, links) und intrazellulär (b, rechts) unter Zusatz von Corticosteron. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur.** Vor der 4-stündigen Inkubation erfolgte eine 16-stündige Aequilibrierungsphase im Medium ohne Zusätze wie Corticosteron und Metyrapon. Anschließende Messung nach 4-stündiger Inkubation mit Corticosteron (1 $\mu$ M) bzw. Metyrapon (100 $\mu$ M).

(●/△ : p<0,001; △/▲ : p<0,001; ○/□: p<0,001; □/■: p<0,001; n=3 bis n= 4;  $\pm$ SEM)

Corticosteron löste eine signifikante Stimulation der Cortisolsekretion aus ( $p < 0,001$ ), (Abb. 71a), die durch Metyrapon stark gehemmt wurde ( $p < 0,001$ ), was vermutlich auf einer Hemmung der Cortisolsynthese aus endogenen Vorläufern beruht (Abb. 71b).

Dagegen änderte die Gegenwart von Aldosteron die basale Cortisolsekretion nicht ( $p > 0,05$ ) (Abb. 72 a). Offensichtlich ist Aldosteron kein Vorläufermolekül in der Cortisolbiosynthese. Metyrapon hemmte auch unter diesen Bedingungen die Cortisolsekretion und senkte die Cortisolfreisetzung deutlich unter den Basalwert unbehandelter Zellen ( $p < 0,001$ ) (Abb. 72a). Die intrazellulär gemessenen Cortisolgehalte waren unter Aldosteron-Einfluss stark vermindert ( $p < 0,001$ ) (Abb. 72b) und konnten durch zusätzlichen Metyrapon-Einsatz nicht weiter gesenkt werden. Aldosteron hatte keinen Einfluss auf die Cortisolsekretion, senkte aber die intrazelluläre Biosynthese deutlich. Metyrapon hemmte die Cortisolfreisetzung Aldosteron-behandelter Zellen, zeigte allerdings keinerlei Einfluss auf die intrazelluläre Cortisolbiosynthese (Abb. 72). Es ist derzeit nicht klar, ob Aldosteron die Cortisolsynthese auch in physiologischen Konzentrationen hemmen kann.



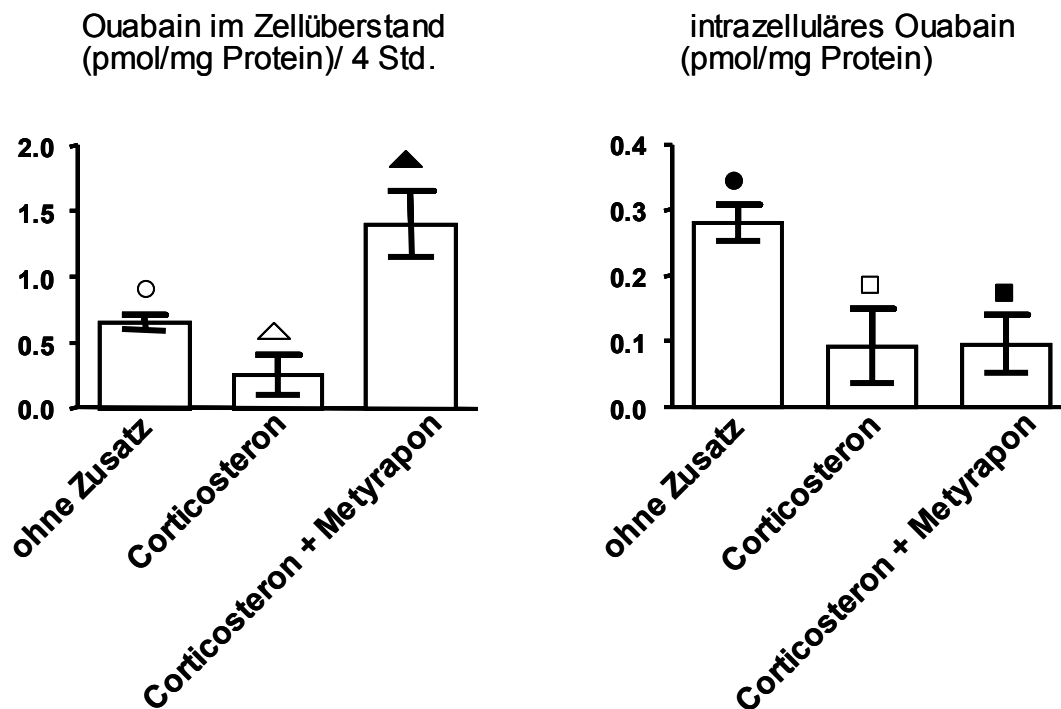
**Abb. 72 a, b:**

**Effekt von Metyrapon auf den Cortisolgehalt im Zellüberstand (a; links) und intrazellulär (b; rechts) unter Zusatz von Aldosteron. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur.** Vor der 4-stündigen Inkubation erfolgte eine 16-stündige Aequilibrierungsphase im Medium ohne Zusätze wie Aldosteron und Metyrapon. Anschließende Messung nach 4-stündiger Inkubation mit Aldosteron (1  $\mu$ M) bzw. Metyrapon (100  $\mu$ M).

(○/ △ :  $p > 0,05$ ; △/ ▲ :  $p < 0,001$ ; ●/ □ :  $p < 0,001$ ; □/ ■ :  $p > 0,05$ ;  $n = 3$  bis  $n = 4$ ;  $\pm$ SEM)



Da Metyrapon jedoch die 11 $\beta$ -Hydroxylierung hemmt, ein Schritt der für die Cortisolsynthese aus Corticosteron nicht erforderlich ist, muss die Blockade der Cortisolsynthese durch Metyrapon aus Corticosteron bzw. Aldosteron auf einer Blockade des Biosyntheseweges aus endogenen Vorläufern beruhen.



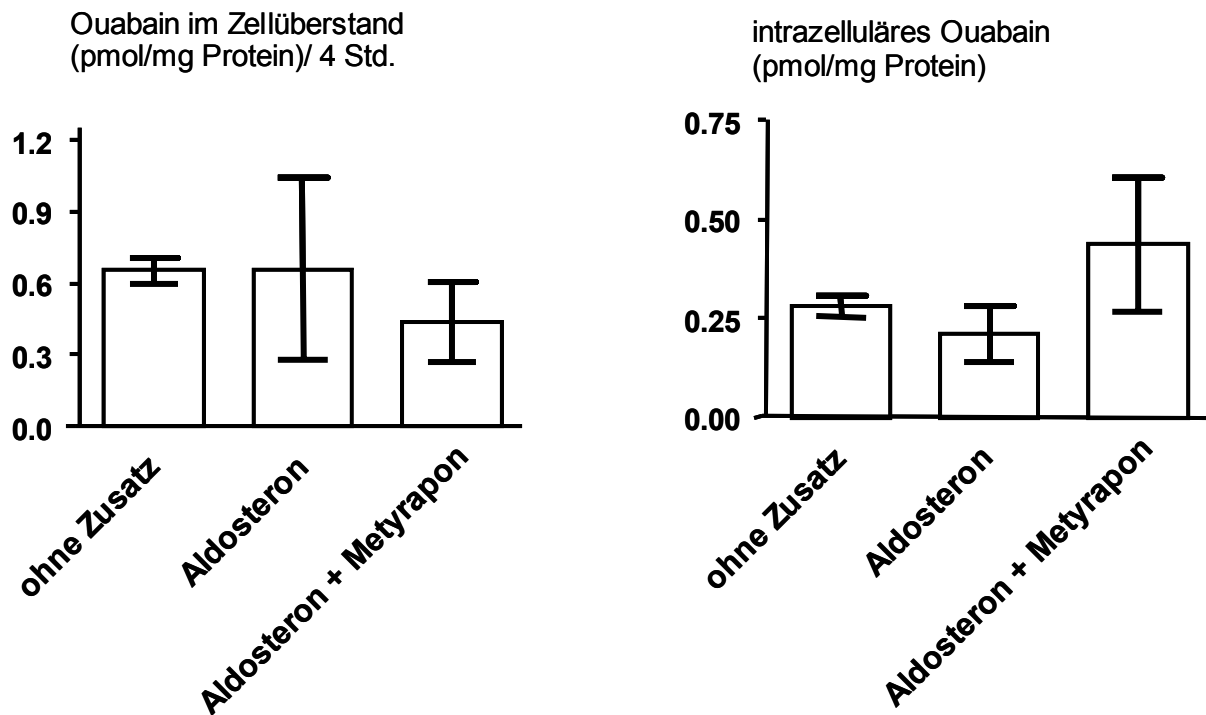
**Abb. 73 a, b:**

**Effekt von Metyrapon auf die Ouabainkonzentration im Zellüberstand (a, links) und intrazellulär (b, rechts) unter Zusatz von Corticosteron. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur.** Vor der 4-stündigen Inkubation erfolgte eine 16-stündige Aequilibrierungsphase im Medium ohne Zusätze wie Corticosteron und Metyrapon. Messung nach 4-stündiger Inkubation mit Corticosteron (1 $\mu$ M) bzw. Metyrapon (100 $\mu$ M).

(○/△ : p>0,05; △/▲ : p<0,05; ●/□: p>0,05; □/■: p>0,05; n=3 bis n= 4;  $\pm$ SEM)

Im Gegensatz zur Cortisolsekretion wurde die Ouabainsekretion durch Corticosteron gehemmt (Abb. 73a) und ebenso auch die Ouabainsynthese (Abb. 73b).

Auch Aldosteron zeigte keine stimulierende Wirkung auf die Ouabainsynthese (Abb. 74) und ebenso wenig wurde die endogene Ouabainsynthese und -freisetzung durch Metyrapon beeinflusst (Abb. 74a, b).



**Abb. 74 a, b:**

**Effekt von Metyrapon auf die Ouabainkonzentration im Zellüberstand (a, links) und in den Zellen (b, rechts) unter Zusatz von Aldosteron. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur.** Vor der 4-stündigen Inkubation erfolgte eine 16-stündige Aequilibrierungsphase im Medium ohne Zusätze wie Aldosteron und Metyrapon. Anschließend Messung nach 4-stündiger Inkubation mit Aldosteron (1  $\mu$ M) bzw. Metyrapon (100  $\mu$ M). (keine statistisch signifikanten Unterschiede messbar, n=3 bis n= 4;  $\pm$ SEM)

Metyrapon zeigte in Anwesenheit von Corticosteron unerwartet einen stimulierenden Effekt auf die Ouabainfreisetzung (Abb.73). Dies könnte möglicherweise eine bessere Verfügbarkeit von Vorläufern der Ouabainsynthese andeuten, die sonst für die Biosynthese von Steroiden in 11 $\beta$ -OH-Gruppen verwendet werden. Die Kombinationen zwischen Metyrapon und Corticosteron bzw. Aldosteron zeigten im übrigen keine messbaren Effekte. Eine Blockade allein der 11 $\beta$ -Hydroxylierung durch Metyrapon hätte laut Hamlyn et al. [63] keine Wirkung auf die Steroidproduktion haben dürfen, da Substrate zugesetzt worden waren (Corticosteron, Aldosteron), die bereits über eine 11 $\beta$ -Hydroxygruppe verfügten. Um diesem Widerspruch nachzugehen, setzten wir im Folgenden bereits von uns geprüfte Stimulatoren der Ouabain- und Cortisolbiosynthese und -freisetzung (Pregnenolon, Progesteron) ein (vgl. Kap. 7.8). Beide müssen bei der Überführung in Ouabain bzw. Cortisol einer 11-Hydroxylierung unterzogen werden. Der Einfluss von Metyrapon auf die Freisetzung bzw. Biosynthese von Cortisol und Ouabain unter Zusatz von Pregnenolon bzw. Progesteron wurde daher gemessen (Abb. 75, 76).

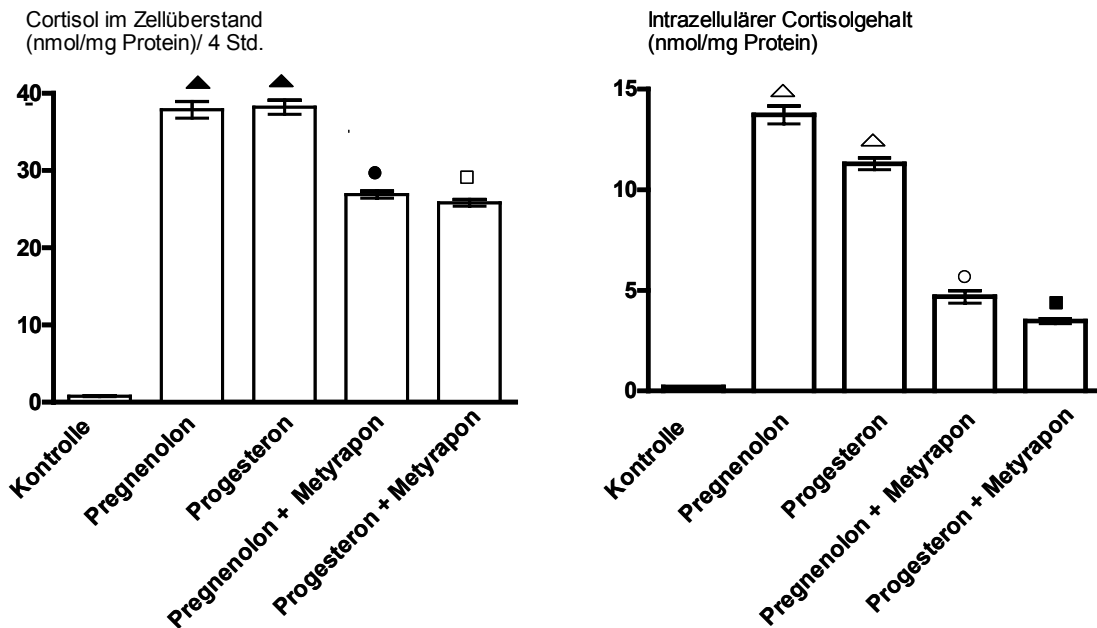


Abb. 75 a, b:

Effekt von Metyrapon auf die Cortisolkonzentration im Zellüberstand (a, links) und in den Zellen (b, rechts) unter Zusatz von Pregnenolon und Progesteron. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur. Vor der 4-stündigen Inkubation erfolgte eine 16-stündige Aequilibrierungsphase in Medium ohne Zusätze von Pregnenolon, Progesteron und Metyrapon. Messung nach 4-stündiger Inkubation mit Pregnenolon, Progesteron (je 100 $\mu$ M) bzw. Metyrapon (100 $\mu$ M). ( $\blacktriangle/\bullet$ :  $p>0,001$ ;  $\blacktriangle/\square$ :  $p<0,001$ ;  $\triangle/\circ$ :  $p>0,001$ ;  $\triangle/\blacksquare$ :  $p<0,001$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)

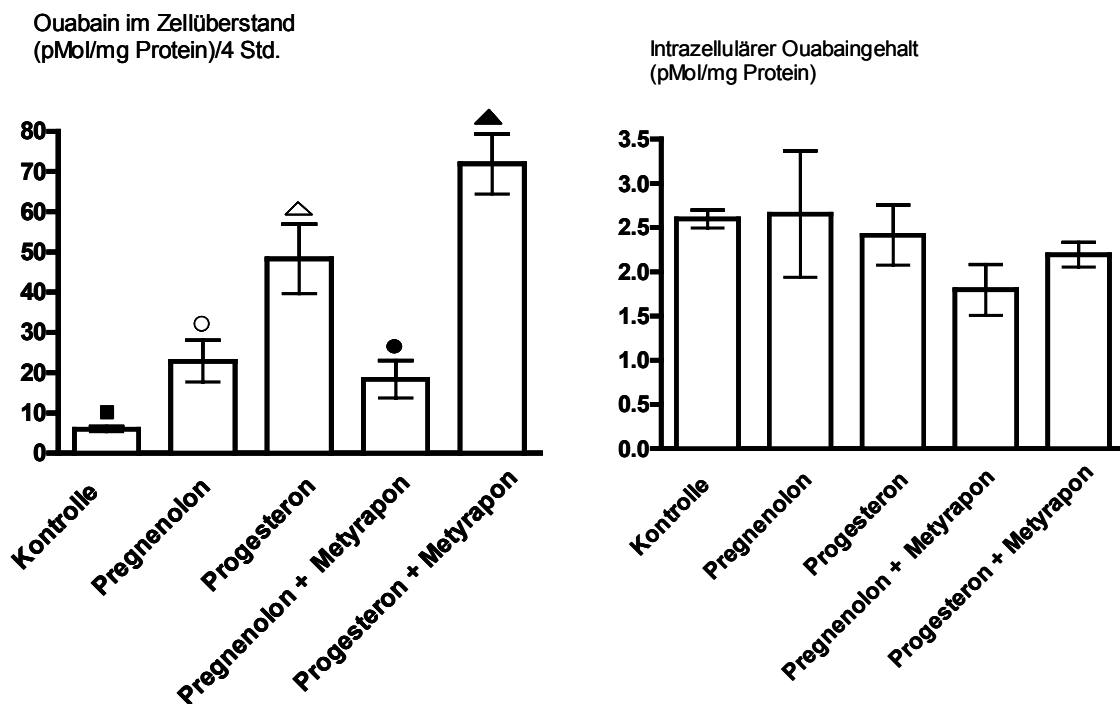


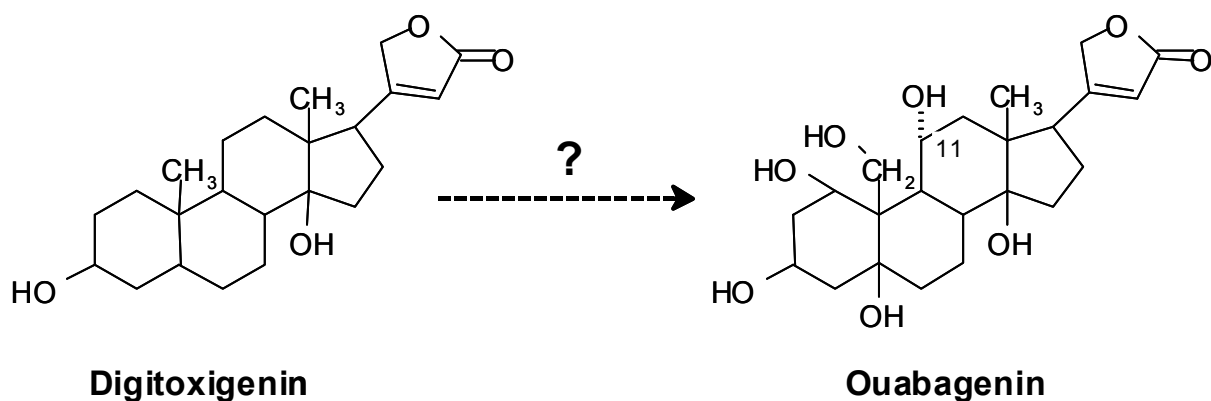
Abb. 76 a, b:

Effekt von Metyrapon auf die Ouabainkonzentration im Zellüberstand (a, links) und in den Zellen (b, rechts) unter Zusatz von Pregnenolon und Progesteron. Messung an Rinder-NNRZ in Kultur. Vor der 4-stündigen Inkubation erfolgte eine 16-stündige Aequilibrierungsphase in Medium ohne Zusätze von Pregnenolon, Progesteron und Metyrapon. Messung nach 4-stündiger Inkubation mit Pregnenolon, Progesteron (je 100 $\mu$ M) bzw. Metyrapon (100 $\mu$ M). ( $\blacksquare/\circ$ :  $p>0,05$ ;  $\blacksquare/\triangle$ :  $p<0,01$ ;  $\triangle/\blacktriangle$ :  $p>0,05$ ;  $\bullet/\circ$ :  $p>0,05$ ;  $\bullet/\blacktriangle$ :  $p<0,001$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)

Metyrapon hemmt sowohl die Pregnenolon- bzw. Progesteron-stimulierte Cortisolfreisetzung (Abb. 75a) als auch die Cortisolsynthese (Abb. 75b) deutlich.

Beim Einsatz von Metyrapon auf die Pregnenolon- bzw. Progesteron-stimulierte Ouabainsekretion ist allerdings keine Hemmung sichtbar, sondern es liegt evtl. sogar eine geringgradige, noch nicht signifikante Stimulierung vor (Abb. 76a). Die Ouabainsynthese aus den Substraten Pregnenolon und Progesteron wird durch Metyrapon nicht beeinflusst (Abb. 76b).

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Experimenten (Abb. 71-76) das Folgende: Corticosteron jedoch nicht Aldosteron kann als Vorläufer der Cortisolbiosynthese dienen (Abb. 71a, b). Aldosteron scheint in der eingesetzten Konzentration von  $1\mu\text{M}$  die Cortisolbiosynthese zu unterdrücken (Abb. 72b). Metyrapon, ein Inhibitor der  $11\beta$ -Hydroxylase, blockiert die Cortisolsynthese aus endogenen Substraten, hat aber keinen Einfluss auf die Ouabainsynthese (Abb. 73b) aus Aldosteron und Corticosteron (Abb. 74b). Deren Moleküle enthalten allerdings bereits eine  $11\beta$ -Hydroxygruppe, sodass dieses Ergebnis zu der Behauptung Hamlyns, Ouabain enthalte eine  $11\beta$ -Hydroxygruppe, nicht im Widerspruch steht. Metyrapon hemmt allerdings auch nicht die Ouabainfreisetzung und – biosynthese aus Vorläufer-Substraten (Pregnenolon oder Progesteron), die einer  $11\beta$ -Hydroxylierung noch unterzogen werden müssen (Abb. 76). Dies lässt sich mit der These Hamlyns nicht erklären. Die  $11\beta$ -Hydroxylase scheint nicht an der Synthese des endogenen Ouabains beteiligt zu sein. Demnach kann es sich bei dem endogen aus Rindernebennieren isolierten „Ouabain-Isomer“ nur um die  $11\alpha$ -Isoform (Abb. 3) handeln und damit um das in Pflanzen nachgewiesene Ouabain, wie von Schneider et al. postuliert [13].

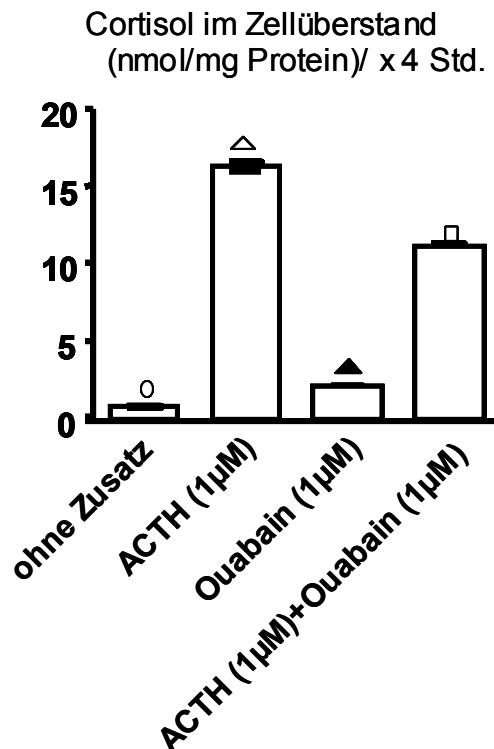


**Abb. 77:**  
**Mögliche Funktion von Digitoxigenin als Vorläufer des Ouabagenins und damit der Ouabainsynthese.**

Digitoxigenin, das Aglykon des Digoxins, ist aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft mit Ouabain als mögliche Vorstufe in der Biosynthese des Ouabains in Betracht zu ziehen (Abb. 77). Es wurde daher geprüft, ob durch Inkubation der Nebennierenrindenzellen mit Digitoxigenin die Ouabainsynthese erhöht wird. Dies schien zunächst der Fall zu sein. Leider mussten wir aber feststellen, dass die Ouabain-Antikörper durch diese Strukturanalogie mit Digitoxigenin kreuzreagieren und dann falsch-positive Ergebnisse lieferten. Da radioaktives Digitoxigenin nicht käuflich erhältlich ist, kann daher derzeit das Zutreffen dieser Annahme nicht überprüft werden.

### 7.9.2. Beeinflussung der Cortisolfreisetzung und -biosynthese durch Ouabain und Digoxin

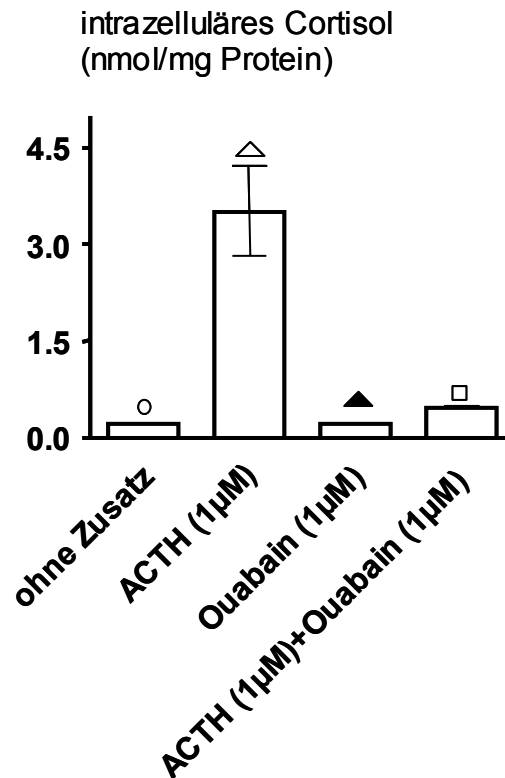
In den bisherigen Untersuchungen waren jeweils die Wirkungen verschiedener Substanzen auf die Cortisolregulation mit denen auf die Ouabainregulation verglichen worden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Ouabain über eine parakrine Wirkung direkt die Cortisolsekretion beeinflusst.



**Abb. 78:**

Effekt von Ouabain auf den Cortisolgehalt im Zellüberstand am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH und Ouabain an Rinder-NNRZ in Kultur. (○/△ :  $p < 0,001$ ; ○/▲ :  $p < 0,01$ ; △/□ :  $p < 0,001$ ; △/▲ :  $p < 0,001$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)

Abbildung 78 zeigt, dass mikromolare Konzentrationen von Ouabain (1 $\mu$ M) die Cortisolsekretion geringgradig stimulieren ( $p < 0,01$ ), aber die bereits ACTH-stimulierte Cortisolsekretion hemmen ( $p < 0,001$ ). Ouabain hat keinen Effekt auf die intrazelluläre Cortisolsynthese (Abb. 79), wohl aber einen deutlich inhibierenden Effekt auf die ACTH-stimulierte Cortisolbiosynthese.



**Abb. 79:**  
**Intrazelluläre Cortisolkonzentration am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH und Ouabain in Rinder-NNRZ in Kultur.**

(○/△ :  $p < 0,001$ ; ○/▲ :  $p > 0,05$ ; △/□ :  $p < 0,001$ ; ▲/□ :  $p > 0,05$ ;  $n=4$ ;  $\pm$ SEM)

Da eine 1 $\mu$ M Dosis an Ouabain ausreicht, um die ACTH-stimulierte Cortisolfreisetzung und -biosynthese deutlich zu hemmen (Abb. 78, 79), testeten wir nun das Ausmaß dieses Effektes bei geringeren Konzentrationen ( $10^{-7}$  M bis  $10^{-10}$  M, Abb. 80 und Abb. 81). Als Vergleich zu Ouabain wurde Digoxin jeweils in den gleichen Dosierungen eingesetzt.

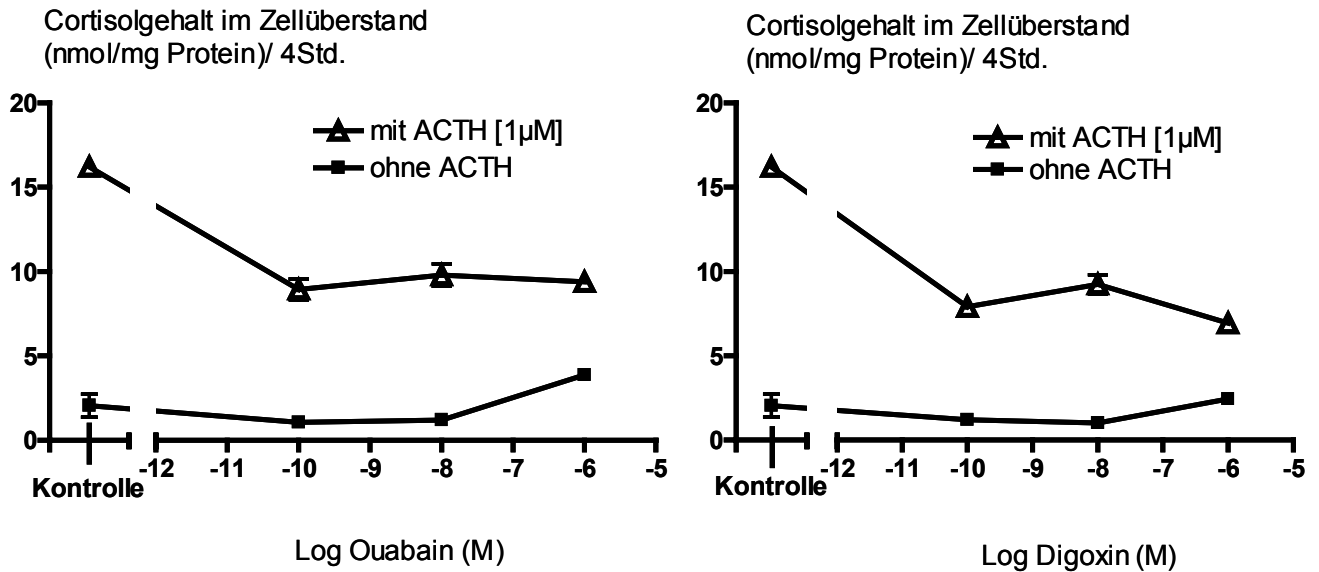


Abb. 80a, b:

Cortisolgehalt im Zellüberstand am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH und Ouabain (a, linke Abb.) bzw. mit ACTH und Digoxin (b, rechte Abb.) an Rinder-NNRZ in Kultur.

(Die Unterschiede zwischen den Ansätzen mit und ohne ACTH sind in beiden Abbildungen signifikant [ $p < 0,01$ ];  $n=4$ ;  $\pm$ SEM); (die SEM-Werte liegen in der Größenordnung der Symbole)

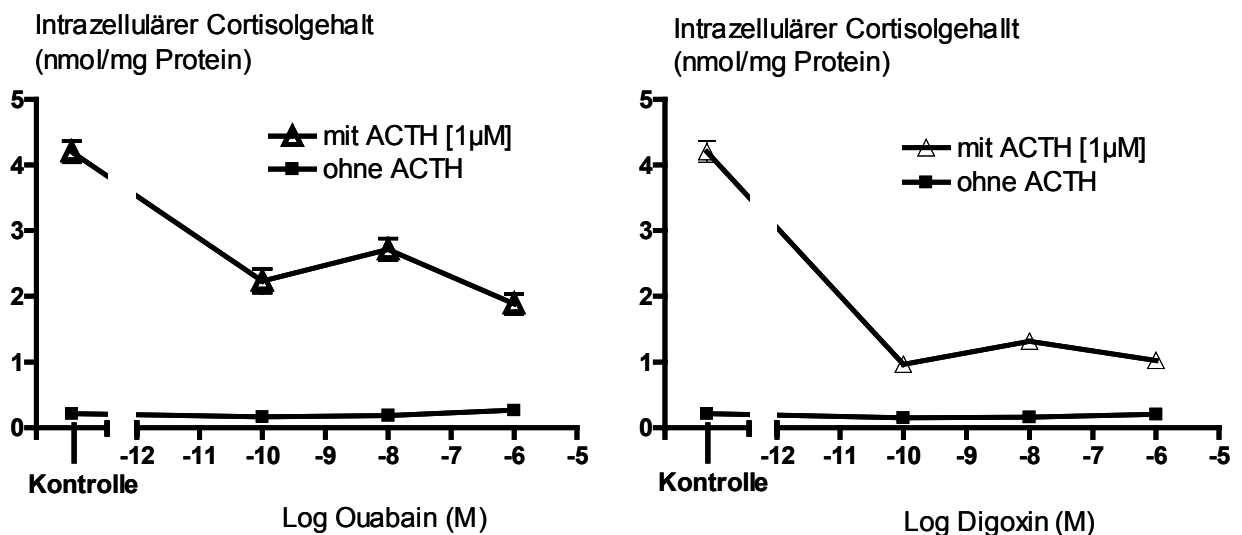


Abb. 81a, b:

Intrazelluläre Cortisolkonzentration am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit ACTH und Ouabain (a, linke Abb.) bzw. mit ACTH und Digoxin (b, rechte Abb.) in Rinder-NNRZ in Kultur.

(Die Unterschiede zwischen den Ansätzen mit und ohne ACTH sind in beiden Abbildungen signifikant [ $p < 0,01$ ];  $n=4$ ;  $\pm$ SEM); (die SEM-Werte liegen in der Größenordnung der Symbole)

In allen submikromolaren Konzentrationen bleibt in Abwesenheit von ACTH ein Effekt auf die Cortisolfreisetzung und -biosynthese sowohl durch Ouabain (Abb. 80 links und 81 links) als auch durch Digoxin (Abb. 80 rechts und Abb. 81 rechts) aus. Eine deutliche Hemmung der Cortisolfreisetzung und -biosynthese wird aber sowohl durch 0,1 nM Ouabain als noch stärker durch 0,1 nM Digoxin erzielt (Abb. 80 und Abb. 81), wenn die Zellen vorher durch ACTH stimuliert worden sind. Mit Hilfe der Cortisolmessung zeigte sich hiermit, dass Ouabain und Digoxin ein sehr ähnliches regulatorisches Verhalten besitzen.

### **7.9.3. Beeinflussung der Cortisolfreisetzung und -biosynthese durch Digitoxigenin**

Ziel war es, wechselseitige Beeinflussungen zwischen den beteiligten Substanzen in der Steroidogenese zu finden und damit auch mögliche Vorstufen des Ouabains. Aufgrund der Ergebnisse aus Kap. 7.9.2 kam nun erneut Digitoxigenin als eine solche unmittelbare Vorstufe des Ouabains in Frage, das sich von diesem nur durch das Fehlen des Zuckers sowie von vier weiteren Hydroxylgruppen unterscheidet. Je strukturell ähnlicher eine Substanz dem Ouabain ist, um so größer ist allerdings gleichzeitig das Risiko, dass diese Substanz bei der Detektion mit dem ELISA fälschlicherweise vom Ouabain-Antikörper erkannt wird (Kap. 7.9.1). Wang et al. 2004 [131] berichteten vor kurzem, dass Digoxin und Digitoxin hemmend auf die Corticosteron-Produktion wirken, nicht aber Ouabain. Aufbauend auf den Ergebnissen aus Kapitel 7.9.2 und der Arbeit von Wang wurde folgende Hypothese formuliert: Wenn Digitoxigenin die Cortisol-Produktion hemmt, verhält es sich ebenso wie Ouabain und die weitere Suche nach nächststehenden Vorstufen kann auf der Grundlage der Digitoxigenin-Struktur erfolgen.

Die in Abb. 82a und 82b dargestellten Ergebnisse lassen jedoch keine eindeutige Antwort zu: Digitoxigenin stimuliert bei 1 mikromolarer Dosierung die Cortisolsekretion hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Mit 100 mikromolarer Dosis allerdings führt Digitoxigenin zu einer ebenso signifikanten Hemmung der basalen Cortisolsekretion (Abb. 82a). Die intrazellulären Cortisol-Gehalte zeigen sehr ähnliche Ergebnisse: Digitoxigenin erhöht die Gehalte bei 1 mikromolarer Dosis und erniedrigt sie bei 100 mikromolarer Dosis bis unterhalb der Cortisol-Gehalte unbehandelter Kontrollzellen. Metyrapon hemmt sowohl die Digitoxigenin-beeinflusste Cortisolsekretion (Abb. 82a) als auch die Cortisolbiosynthese (Abb. 82b) nahezu



vollständig und erniedrigt die intrazellulären Cortisolgehalte unter die Gehalte unbehandelter Nebennierenrindenzellen. Vermutlich hemmt Metyrapon die Cortisolsynthese aus endogenen (intrazellulären) Vorläufermolekülen.

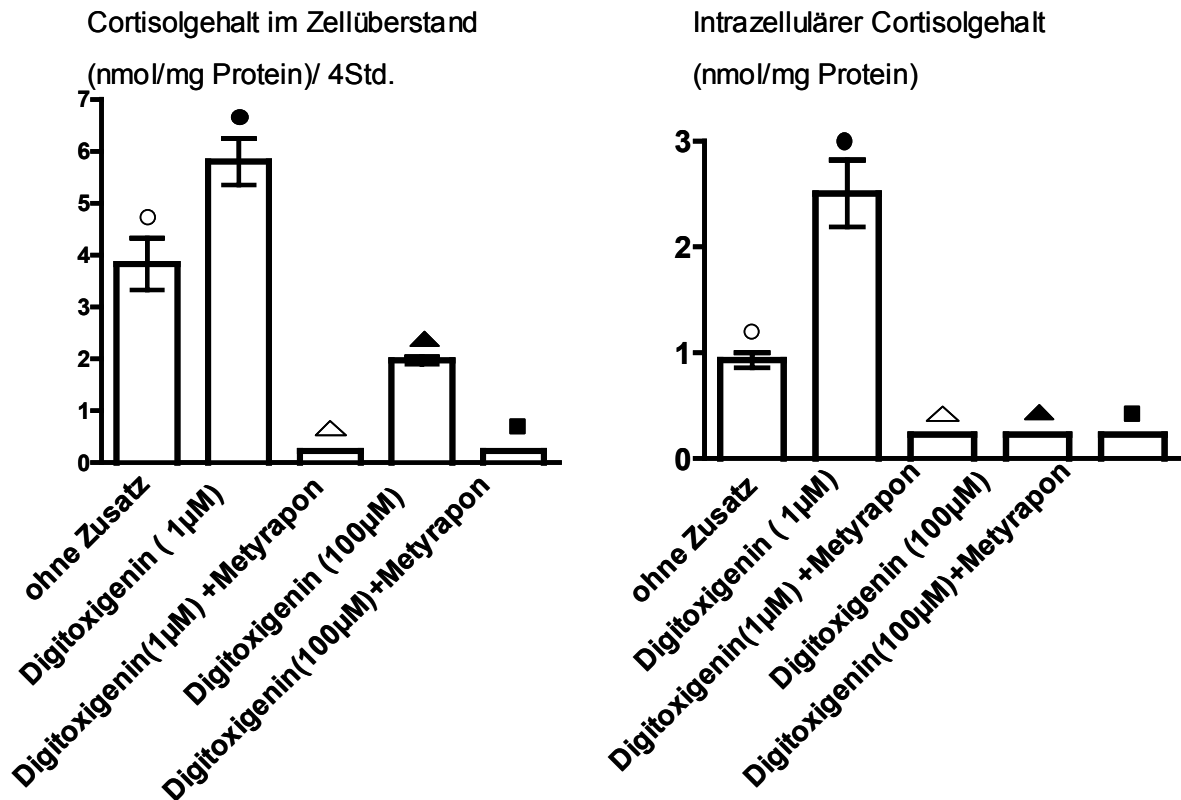


Abb. 82a, b:

Cortisolkonzentration im Zellüberstand (a, links) und intrazellulär (b, rechts) am Ende einer 16-stündigen Aequilibrierungsphase und anschließender 4-stündiger Inkubationsphase mit Digitoxigenin bzw. Digitoxigenin und Metyrapon (100µM). Messung an Rinder-NNRZ in Kultur.;

(Abb. 82a: ○/●: p<0,01; ○/▲: p<0,01; ●/△: p<0,001; ●/▲: p<0,001; ▲/■: p<0,01)

(Abb. 82b: ○/●: p<0,001; ●/△, ●/▲, ●/■: p<0,001; n=4; ±SEM)

Es ist bekannt, dass der Cortisolgehalt im Blut bei Kreislaufbelastungsstress ansteigt; ebenso steigt aber auch die Konzentration des Ouabains im Blut an [216]. Es ist derzeit nicht klar, ob die Stimulierung der Cortisolsynthese durch Herzglykoside (z.B. Digitoxigenin) auch in therapeutisch interessanten Konzentrationen erfolgt und ob dieser Stress (z.B. als Kreislaufbelastungsstress) auch durch Ouabain allein imitiert werden kann. Sollte das der Fall sein, könnte dies auf eine neue Steuerfunktion des Ouabains in der Cortisolbiosynthese hinweisen.

## **8. Diskussion**

### **8.1. Sekretionsverhalten von Nebennierenzellen von Rindern in Suspension und in Kultur**

In dieser Arbeit wurden Fragen zur Biosynthese und ihrer Steuerung von Ouabain und Cortisol untersucht. Hierfür wurde die Präparation und Kultivierung von Zellen der Nebennierenrinde sowie die Detektion der Cortisol- bzw. Ouabain-Konzentrationen intrazellulär und im Zellüberstand optimiert. Cortisol kann wesentlich zuverlässiger gemessen werden als Ouabain, da die Rinder-Nebennierenrindenzellen ca. 900.000-fach mehr Cortisol als Ouabain produzieren (vgl. Tab. 15a und 15b). Um eine Aussage über die Intaktheit und Synthesefähigkeit der Zellen zu erhalten, wurde die Cortisolbildung jeweils parallel zu der des Ouabains bestimmt. Cortisol (Abb. 31-33) und Ouabain (Abb. 35, 36) sind in Primärkulturen von Nebennierenrindenzellen des Rindes nachweisbar. Versuche, beide Steroide in Zellkulturen aus dem Nebennierenmark (PC12-Zelllinie) (Abb. 40) oder in einer humanen Nebennierenrinden-Zelllinie nachzuweisen (NCI-295R), gelangen nur für Cortisol zuverlässig; die Ouabainsynthese-Raten waren zu gering. Frisch präparierte Nebennierenrindenzellen zeigten eine deutlich stärkere Syntheseleistung pro Stunde in Suspension als in Zellkultur (Abb. 31-33). Da die Ouabainfreisetzung allerdings nur an NNRZ in Kultur zuverlässig messbar war (vgl. Abb. 35 und 36), wurden alle weiteren Untersuchungen zur Ouabainfreisetzung und -biosynthese an NNRZ in Primärkultur durchgeführt. ACTH stimulierte in primären Zellkulturen aus Nebennierenrindenzellen des Rindes die Freisetzung von Cortisol und Ouabain (Abb. 33-31, 36), was allerdings bezüglich des Ausmaßes differenziert zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppen Dupré-Aucouturier et al. und Laredo et al. [211, 217] betrachtet werden muss (Kap. 8.4).

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass die Untersuchung des Sekretionsverhaltens von Ouabain und Cortisol mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode zuverlässige Messergebnisse für primäre NNRZ in Kultur zeigte. Mit primären NNRZ in Suspension, primären NNMZ, PC12-Zellen und NCI-295R-Zellen allerdings war ein sicherer Nachweis von Ouabain nicht möglich. Entweder ist die Empfindlichkeit der Nachweismethode (des ELISA-Verfahrens bzw. der hier verwendeten Antikörper) oder aber eine unterschiedliche Präparations- bzw. Kultivierungsmethode (Kap. 8.4) Ursache für diese unzureichende Nachweisbarkeit.

## **8.2. Intrazelluläre Ouabain- und Cortisolgehalte in Rinder-NNRZ**

Hamlyn et al. [25] und Laredo et al. [50] berichten, dass Nebennierenrindenzellen in Kultur konstante intrazelluläre Ouabainkonzentrationen haben, und es keinen Unterschied gibt zwischen unstimulierten und mit ACTH bzw. Angiotensin II stimulierten Zellen [50, 163, 165]. Hieraus wurde geschlossen [25], dass die Nebennierenrindenzellen Ouabain synthetisieren können, da eine gesteigerte Sekretion bei konstantem intrazellulärem Steroidgehalt nur durch Neusynthese möglich ist.

In dieser Arbeit wurde zunächst mit der gleichen Methode wie in den oben zitierten Publikationen die intrazelluläre Ouabain- und Cortisol-Konzentration bestimmt. Dazu wurden die NNRZ durch Tiefrieren (-20°C) und anschließendes Auftauen aufgebrochen. Es stellte sich allerdings heraus, dass diese Methode im Falle des Ouabains nur einen Teil des intrazellulären Ouabains freisetzt (Abb. 37a, b). Bei einem vollständigen und korrekten Ouabainnachweis muss eine absolute Zunahme des Proteinwertes einer Zellsuspension mit der in diesen Zellen enthaltenen Ouabainmenge korrelieren. Erst nach einer zusätzlichen Ultraschallbehandlung der aufgetauten Zellen konnte Ouabain vollständig gemessen werden; für die Cortisolbestimmung war diese zusätzliche Ultraschallbehandlung nicht erforderlich.

Nach meinen Befunden kam es unter Anwendung der veränderten Zellaufschluß-Methode sehr wohl zu einer Zunahme von intrazellulärem Ouabain unter ACTH und Pregnenolon (Abb. 38, 53, 68). Die vergleichende Beobachtung des ACTH-bedingten Anstieges des intrazellulären Ouabains und des Cortisols lässt vermuten, dass beide Steroide intrazellulär in unterschiedlicher Weise oder in unterschiedlichem Ausmaß gespeichert werden.

Die Schlussfolgerung der Arbeitsgruppen um Hamlyn et al. und Laredo et al. [25, 50, 165], dass Nebennierenrindenzellen Ouabain synthetisieren können, wird damit unterstützt. Vermutlich ist die Zusatzbehandlung mit Ultraschall nur dann erforderlich, wenn das nachzuweisende Steroid, wie im Falle des Ouabains, in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegt.

### **8.3. Energieabhängigkeit der Cortisolfreisetzung aus Rinder-NNRZ**

Cortisol soll aus den Nebennierenrindenzellen mit Hilfe des MDR1-Transporters (P-Glycoprotein), einem primär-aktiven Transporter [218] ausgeschleust werden. Es wurde daher untersucht, ob dieses Transportsystem an der Steroidhormonfreisetzung beteiligt ist und ob Energiemangel zu einem Verlust der Cortisolsynthese und –freisetzung führen.

Die Blockade der Energiegewinnung in den NNRZ resultierte in einer Abnahme der ACTH-stimulierten Cortisolsynthese: Antimycin A, das den Elektronentransport der Atmungskette auf der Stufe der Umsetzung von Cytochrom-b zu Cytochrom-c1 blockiert (und so auch die Energiebereitstellung für die ATP-Synthase) hemmte die Ouabainfreisetzung und -bildung (Abb. 42, 46, 49); CCCP, das den Protonengradienten über die intramitochondriale Membran zerstört und somit die Atmungskette von der ATP-Synthase entkoppelt, hemmte erwartungsgemäß ebenfalls die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion und –biosynthese hochgradig (Abb. 44, 47, 48, 49).

Auch Oligomycin, das die mitochondriale ATP-Synthase blockiert, hemmt bei relativ geringer Konzentration die Cortisolfreisetzung und –biosynthese (Abb. 43, 44, 46, 48). Die gemessenen Hemmwirkungen erfolgten jeweils sowohl während der ersten 120 Minuten als auch über weitere 14 bzw. 48 Stunden hinweg (Abb. 42-49). Die Ursache für die verminderte Cortisolsekretion ist damit in dem zellulären ATP-Mangel zu suchen.

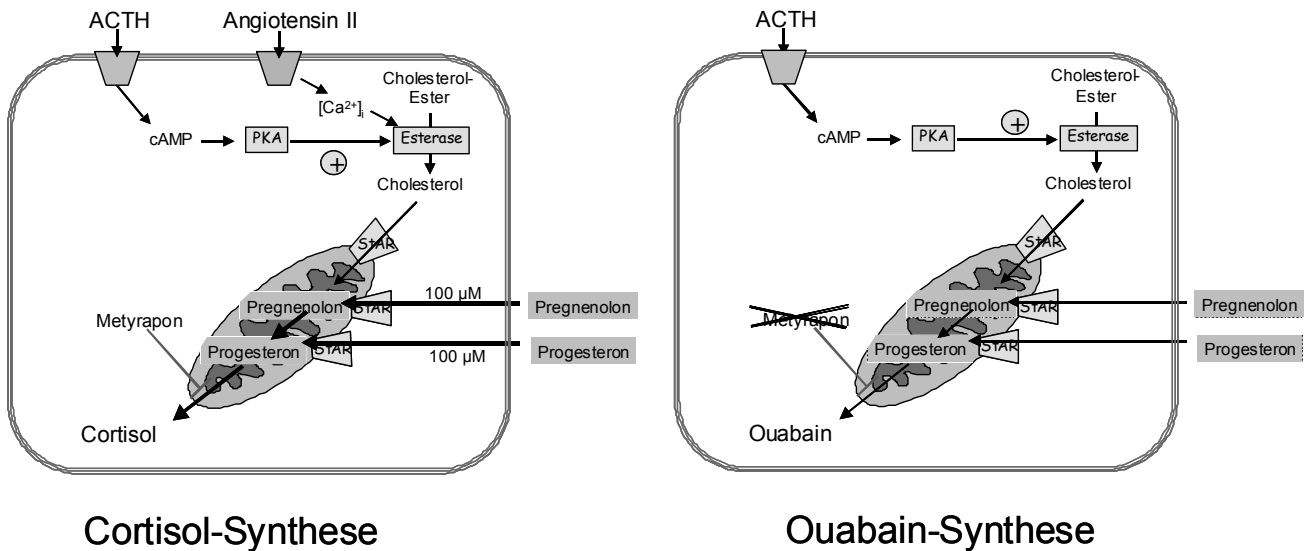
Cyclosporin A (CSA) allerdings (Abb. 45), das als Substrat des MDR1-Transporters um den Transport weiterer Substrate konkurriert und daher hemmt, zeigte nur eine geringgradige Hemmung der Cortisolsekretion. Möglicherweise erfolgt die Ausschleusung des Cortisols aus der Zelle nicht allein über den MDR1-Transporter. Ob hieran der OAT3 beteiligt ist [184], wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

#### **8.4. ACTH und Angiotensin II unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die Regulation von Cortisol und Ouabain in Rinder-NNRZ**

Nach Berichten anderer Autoren sollen ACTH und Angiotensin II die Cortisol- und Ouabain-Abgabe aus Nebennierenrindenzellen stimulieren [4, 50, 165, 219, 220]. Direkt vergleichende Messungen der Cortisol- und Ouabaingehaltes im Zellüberstand von NNRZ bzw. intrazellulär zeigten, dass wir diese Beobachtungen nur teilweise bestätigen können.

Wir beobachteten mit bovinen primären Nebennierenrindenzellen in Kultur ein sehr unterschiedliches Ausmaß der durch ACTH und Angiotensin II bedingten Stimulierung der Cortisol- bzw. Ouabainfreisetzung und –biosynthese. Unsere Resultate weichen von denen der Arbeitsgruppe Laredo et al. [50] insofern ab, als bei ihnen Angiotensin II und ACTH - beide jeweils mit einer Konzentration von jeweils 10nM- die Cortisolsekretion um das 14-fache und die Ouabainsekretion um das vierfache steigern. Erst bei einer Konzentration von 1µM ACTH bzw. 100nM Angiotensin II zeigt sich in unseren Experimenten eine deutliche Stimulation, verglichen jeweils mit unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 50-53, Tab. 14): ACTH steigert die Cortisolfreisetzung um den Faktor 5, die Ouabainfreisetzung aber nur um den Faktor 2. ACTH stimuliert die Ouabainbiosynthese um den Faktor 2 und die Cortisolbiosynthese um den Faktor 42. Angiotensin II bewirkt keine Steigerung der Ouabainfreisetzung und steigert die Cortisolfreisetzung um den Faktor 2, sowie die Ouabainbiosynthese um den Faktor 7.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass das von uns gemessene Ausmaß der ACTH-Wirkung auf die Cortisolfreisetzung und auf die Ouabainfreisetzung deutlich geringer ist als das von Laredo et al. publizierte [50], ebenso wie auch das Ausmaß der Angiotensin II-Wirkung auf die Cortisolfreisetzung und –biosynthese. Eine stimulierende Wirkung von Angiotensin II auf die Ouabainsekretion bzw. –biosynthese fanden wir entgegen der ebenfalls von Laredo et al. publizierten Ergebnisse [163] eindeutig nicht. Mit dem Faktor 42 zeigte ACTH allerdings eine sehr deutliche Stimulierung der Cortisolbiosynthese. Darüber hinaus stellten wir fest, dass ACTH und Angiotensin II keine additive Wirkung auf Cortisol und Ouabain besitzen.

**Abb. 83:**

**Möglicher Mechanismus der ACTH-Stimulierung der Ouabainsynthese durch ACTH analog der des Cortisols (Hypothese).** Dargestellt ist hier eine NNRZ für die Cortisol- (links) und eine NNRZ für die Ouabainsynthese (rechts) mit jeweils einem Mitochondrium (oval, grau-unterlegt). Die Hydroxylierung von Steroidhormonen durch die Cytochrome P450-Hydroxylasen erfolgt in diesen Mitochondrien der NNRZ. Cholesterol wird über StAR in diese aufgenommen. Wenn durch eine ACTH- oder Angiotensin II-bedingte Stimulierung der Cholesterol-Esterase mehr freies Cholesterol zur Verfügung steht, wird mehr Substrat für die Biosynthese des Cortisols bzw. Ouabains verfügbar.

Der limitierende Schritt der Cortisolbiosynthese besteht in der intramitochondrial für die Hydroxylierung zur Verfügung stehenden Cholesterol-Menge, die durch ACTH nach Aktivierung der StAR-Proteine (Steroidogenic Acute Regulatory Proteins) erhöht wird [189, 191] (Abb. 83). Eine Expressionssteigerung der an der Cortisolbiosynthese beteiligten Enzyme ist während der Beobachtungsperiode kaum von Bedeutung, da die Syntheseleistung in den Mitochondrien vor allem durch die im Cytosol vorhandene Cholesterolmenge bestimmt wird. ACTH nimmt hierauf Einfluss, indem es über den second Messenger cAMP und die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) die Aktivität der Cholesterol-Esterase steigert (Abb. 83) [164, 191]. Angiotensin II hingegen steigert die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) [164]. Die daraus resultierende Phosphorylierung der Cholesterol-Esterase führt zu ihrer Aktivierung und damit zu einer beschleunigten Überführung des Cholesterol-Esters in Cholesterol, wodurch die Cholesterol-Konzentration im Cytosol gesteigert wird. Über die Steigerung der StAR-Proteinexpression wird nun gleichzeitig vermehrt Cholesterol über die StAR-Proteine in die Mitochondrien aufgenommen [189] und damit werden die

nachfolgenden Biosynthese-Schritte beschleunigt. Dies resultiert in einer Zunahme der intrazellulären Cortisolmenge, falls dieses nicht sofort aus der Zelle ausgeschleust wird.

Vermutlich werden auch die anderen Steroid-Substrate (Pregnenolon, Progesteron) (Kap. 8.5) über die StAR-Proteine in die Mitochondrien aufgenommen. Die Enzyme der Biosynthesekette scheinen dabei durch das hohe Angebot an Pregnenolon und Progesteron besser ausgelastet zu werden.

Wenn diese Interpretation richtig ist, sollte sie aber auch für die Ouabainsynthese gelten, denn sowohl die Cortisol- als auch die Ouabainbiosynthese erfolgen in den Zellen der Zona fasciculata [53] und sowohl Pregnenolon als auch Progesteron werden in den Mitochondrien dieser Zellen in Cortisol umgewandelt [221].

Die Stimulierung der Ouabainsynthese durch ACTH aus Pregnenolon (Abb. 63) mag auf ein stimulierbares Isoprotein des StAR zurückzuführen sein, das für die Aufnahme der anderen Steroide für die Ouabain- und die Cortisolsynthese nicht existiert.

Zusammenfassend ergibt sich auf die zu Beginn der Arbeit gestellte Frage, ob Hormone, die die Cortisolbiosynthese und –freisetzung beeinflussen auch gleichzeitig die Ouabainbiosynthese und –freisetzung verändern die folgende Antwort: In den von uns präparierten Nebennierenrindenzellen des Rindes lässt sich eine ACTH-Stimulierung der Cortisol- und Ouabainsekretion nachweisen, die in ihren Ausmaßen jedoch von bisher publizierten Ergebnissen der Arbeitsgruppe Laredo et al. [50] abweicht. Es ist derzeit allerdings nicht klar, weshalb die in Giessen präparierten Zellen keine nachweisbare Angiotensin II-Stimulierung der Ouabainsynthese und Sekretion zeigten. Die Nachweismethode für Ouabain kann dabei eine Rolle spielen, aber auch methodische Unterschiede sind in Betracht zu ziehen: Eine andere Kollagenase mit längerer Verdauzeit bei der Isolierung der NNRZ, in Verbindung mit einer mehrtätigen Aequilibrierungsphase könnte ein Grund für eine nachweisbare Angiotensin II-vermittelte Stimulation der Ouabainfreisetzung bzw. –biosynthese in den Experimenten der Arbeitsgruppe Laredo sein [50, 222]. Möglicherweise ist unsere, kürzere Aequilibrierungsphase mit 16 Stunden im Vergleich zu Laredo et al., der die Zellen zwei Tage kultiviert, ein wesentlicher Grund dafür, dass bei unseren Zellen die Angiotensin II-Rezeptoren evtl. nicht mehr vorhanden sind und unter den von Laredo et al. verwendeten Kulturbedingungen wieder existieren. Möglicherweise aber hat der lange Verdau bei der Zellisolierung aber in Verbindung mit einer relativ langen Aequilibrierungsphase bei Laredo zu einem Rezeptorexpressionsmuster geführt, das sich deutlicher an *in-vitro* Verhältnisse angepasst hat als dies bei der von uns verwendeten Methode der Fall ist.

## 8.5. Pregnenolon und Progesteron als Biosynthese-Vorstufen von Ouabain

Pregnenolon und Progesteron werden als mögliche Vorstufen der Biosynthese des endogenen Ouabains diskutiert [4]. Beide Substanzen sind aber nachweislich auch Vorstufen der Biosynthese des Cortisols [177].

Wurden die NNRZ mit einer Konzentration von 1 mikromolar an Pregnenolon bzw. Progesteron im Kulturmedium über vier Stunden inkubiert, beobachtete man eine geringgradige Stimulation der Cortisol- und Ouabainfreisetzung (Abb. 56, 57, 60, 61).

Wurde eine hohe Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt, zeigte sich eine hochgradige Stimulierung der Freisetzung von Cortisol und Ouabain (Abb. 56, 57, 60, 61). Die Konzentrationen der Steroidhormone der Nebenniere liegen beim Menschen im Blut im Bereich von  $10^{-7} - 10^{-10}$  molar (Tabelle 16). Die Konzentrationen an Pregnenolon und Progesteron, die die Synthese von Cortisol und Ouabain in Nebennierenrindenzellen *in-vitro* erhöhen, liegen somit weit oberhalb des physiologisch üblichen Bereiches dieser Hormone.

**Tabelle 16: Plasmakonzentrationen von Hormonen der Nebenniere im Blut des Menschen [223]**

Steroid-Hormon	Plasma-Konzentration ( $\mu\text{g}$ / Liter)	Plasma-Konzentration (Mol/ Liter)
Cortisol	60 - 250	$1,7 - 6,9 \times 10^{-7}$
Corticosteron	4 - 20	$1,0 - 6 \times 10^{-8}$
Aldosteron	0.02 - 0,15	$1,0 - 4 \times 10^{-10}$
Progesteron	0,075 – 2,13	$2,39 - 67 \times 10^{-10}$

Die halbmaximale Stimulierung der Cortisolsynthese aus Progesteron von ca.  $2 \times 10^{-5}$  M (Tabelle 15b) und von  $1,5 \times 10^{-5}$  M aus Pregnenolon sowie der Ouabainsynthese von  $3,4 \times 10^{-5}$  M aus Progesteron (Tabelle 15b) und von  $2,1 \times 10^{-5}$  M aus Pregnenolon zeigen, dass Nebennierenrindenzellen die beiden Steroidhormone erst bei sehr hohen -für Zellen *in-vivo*-toxischen Konzentrationen als Zwischenprodukte für die Biosynthese von Cortisol und Ouabain aufgenommen werden können (Abb. 83).

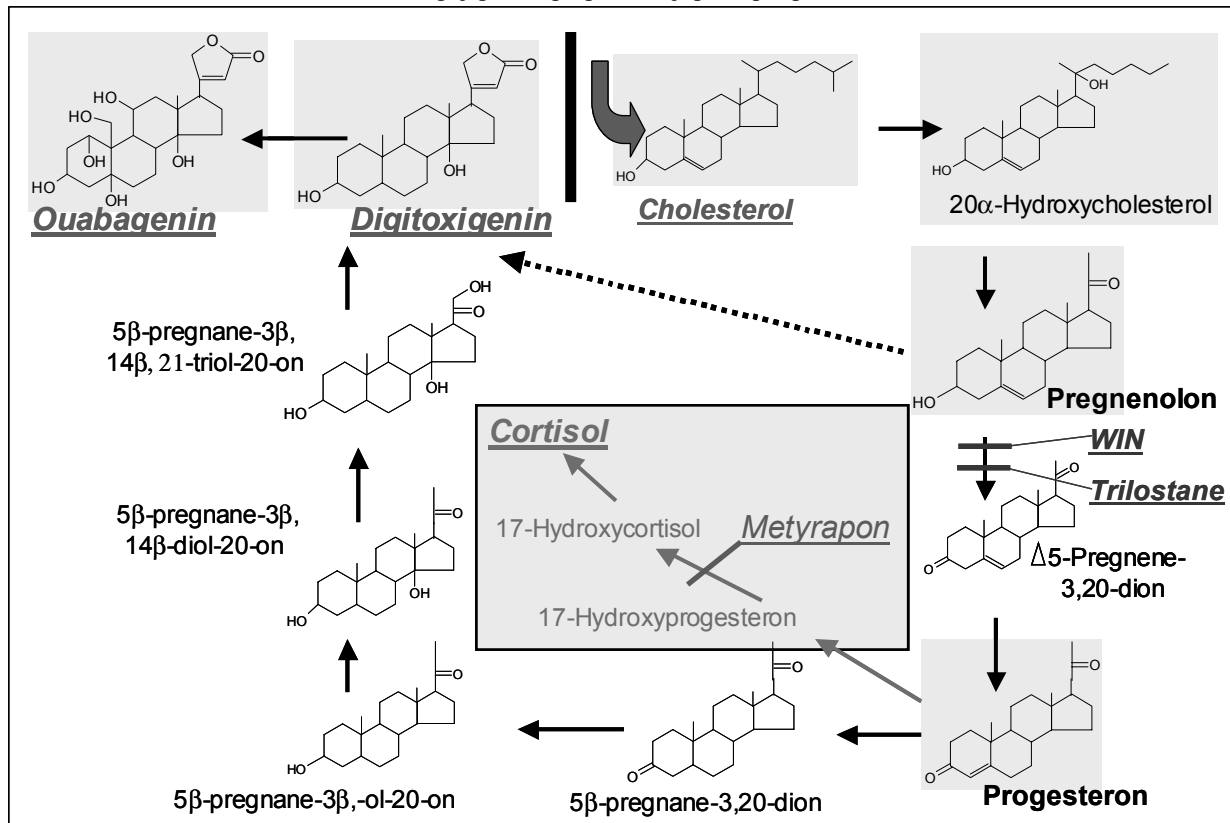


ACTH stimuliert die Sekretion von Cortisol und Ouabain ins Kulturmedium. Diese erhöhte Sekretion in Abwesenheit extrazellulärer Synthese-Substrate (Abb. 62-65) muss zumindest partiell auf einer Stimulierung der Synthese in den Mitochondrien beruhen (Abb. 83), denn ACTH erhöht die Sekretion von Cortisol (Abb. 50) ohne einen Einfluss auf die  $K_s$ -Werte der Progesteron- und Pregnenolon-Aktivierung der Cortisolsynthese bzw. -sekretion (Abb. 62, 64, Tab. 15a, b) zu haben.

Zusammenfassend beantworten wir die Frage, über welche steroidalen Vorstufen die Biosynthese von Ouabain in der Nebenniere erfolgt damit, dass Pregnenolon und Progesteron einerseits beide Vorläufer von Cortisol und Ouabain sind. Jedoch wird andererseits nur die Cortisolfreisetzung durch Pregnenolon und Progesteron in gleichem Maße stimuliert. Die Ouabainfreisetzung wird durch Pregnenolon nur geringgradig stärker stimuliert als durch Progesteron (vgl. Abb. 63 und Abb. 65), was sich anhand der intrazellulär gemessenen Ouabaingehalte deutlicher bemerkbar macht (Abb. 68). Diese Beobachtung widerspricht jedoch Doris, 1994 und 1996 [46, 224], der die Bedeutung des Pregnenolons als geringer im Vergleich zu Progesteron ansieht. Hamlyn fand 1998 [10] bei der Hemmung der  $3\beta$ -HSD durch Trilostane, wodurch die Bildung von Progesteron aus Pregnenolon verhindert wird, erstaunlicherweise eine Zunahme der Ouabainbiosynthese. Daraus schloss er, dass die Ouabainbiosynthese von Cholesterol zu Pregnenolon führt und danach einen anderen Weg über bisher unbekannte Zwischenstufen einschlägt (Abb. 84). Er sieht Progesteron nicht als Bestandteil der Ouabainbiosynthese. Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse stehen mit dieser These Hamlyns somit nicht im Einklang.

Die Beobachtung, dass die Steroide Pregnenolon und Progesteron in pharmakologischen, also unphysiologischen Konzentrationen, sowohl die Ouabain- als auch die Cortisolsynthese sättigen (Abb. 62-66, Tab. 15a, b) ist ein Indiz dafür, dass der Pool der Vorläufer-Metaboliten der Cortisol- und der Ouabainsynthese aus extrazellulären Quellen evtl. unter Einschaltung eines niederaffinen Transporters aufgefüllt werden. Dabei ist derzeit wahrscheinlich, jedoch nicht bewiesen, dass der für Pflanzen erarbeitete Biosyntheseweg von Digitoxigenin aus Cholesterol auch für Säugerzellen zutrifft (Abb. 84).

### Hypothese der Biosynthese von Cardenoliden *in-vitro* durch Nebennierenrindenzellen



**Abb. 84:** Hypothese der Biosynthese der Cardenolide in Pflanzen nach Stuhlemmer und Kreis (1996) [1] sowie Lichtstein et al., 1998, [3] als Grundlage für eine Hypothese der Biosynthese von Cardenoliden *in-vitro* durch NNRZ des Rindes. Grau unterlegt: In Rinder-Nebennierenrindenzellen gefundene Zwischenstufen. Hamlyn (1998) [10] postuliert eine Abzweigung des Biosyntheseweges nach der Bildung von Pregnenolon (vgl. langer gestrichelter Pfeil in der Abbildung), da eine Hemmung der Progesteron-Bildung durch WIN bzw. Trilostane statt zu einer verminderten Cardenolidsynthese zu einer Erhöhung führt.

Es ist derzeit auch nicht bekannt, ob Digitoxigenin als Vorläufer des Ouabains dient. Die bisher hierzu vorliegenden Daten scheinen nicht für die in Abb. 84 angegebene Sequenz zu sprechen [3, 63]. Da sich jedoch viele der früher als Beweis für eine andere Struktur des Ouabains oder einen anderen Syntheseweg erbrachten Resultate [63] nicht als wiederholbar erwiesen, ist es viel wahrscheinlicher anzunehmen, dass ein für Pflanzen existierender Syntheseweg auch für tierische Zellen gilt. Die für einen separaten Syntheseweg sprechenden Experimente von Hamlyn et al. [63] sind schwer mit der Tatsache zu vereinen, dass Progesteron laut unserer Ergebnisse ein gutes Vorläufersubstrat der Ouabainsynthese ist (Abb. 65).

## **8.6. Beeinflussung der Cortisol- und Ouabainproduktion durch Corticosteron und Aldosteron**

Obwohl die Sekretion von endogenem Ouabain und Aldosteron über unterschiedliche Signalwege stimuliert wird [164], war nicht auszuschließen, dass die beiden in den Zona glomerulosa-Zellen synthetisierten Steroide sich gegenseitig in ihrer Sekretion beeinflussen. Es war auch nicht auszuschließen, dass Aldosteron oder eine Aldosteronvorstufe bzw. Corticosteron, als Substrat für die Ouabainsynthese dienen.

Corticosteron als Vorstufe des Cortisols stimulierte erwartungsgemäß die Cortisol-Produktion (Abb. 71a, b), während sich Aldosteron als ein Endprodukt eines eigenen Syntheseweges der Steroidogenese reaktionslos gegenüber der Produktion verwandter Endprodukte, wie hier gegenüber dem Cortisol (Abb. 72 a, b), verhielt.

Sowohl Corticosteron als auch Aldosteron scheiden als mögliche Biosynthese-Vorstufen für Ouabain eindeutig aus, da sie keine stimulierenden Wirkungen zeigten (Abb. 73, 74) Dies verneint eindeutig im Falle des Corticosterons und des Aldosterons die Frage, ob Hormone, die die Cortisolbiosynthese bzw. –freisetzung beeinflussen, gleichzeitig auch Wirkungen auf die Ouabainbiosynthese und –freisetzung ausüben.

Die Gemeinsamkeiten von Aldosteron und Ouabain beziehen sich zusammenfassend auf eine Synthese im gleichen Nebennierenrindenzelltyp und auf sich z.T. überschneidende Regulationsmechanismen. Weder sind Aldosteron und seine Vorstufe oder Corticosteron Teil der Steroidogenese von Ouabain, noch beeinflussen sie parakrin dessen Freisetzung.

## **8.7. Ouabainsynthese und die Frage nach der Existenz einer 11 $\alpha$ - oder 11 $\beta$ -Hydroxygruppe im endogenen Ouabain der Säuger**

Obwohl das aus den Organen der Rinder isolierte Ouabain sich als strukturell identisch mit dem aus Pflanzen isolierten Ouabain erwies [13], hält sich hartnäckig die Ansicht, das im Säugetier oder im Menschen vorkommende endogene Ouabain sei nur ein Strukturisomer. Die Beweise für diese Annahme sind bisher nicht stichhaltig. Vor kurzem berichtete Hamlyn et al. (2003) [63], dass Metyrapon, ein Hemmstoff der 11 $\beta$ -Hydroxylierung bei Steroiden [63, 161] die Biosynthese sowohl von Ouabain als auch von Aldosteron hemmt. Wir haben diese

These mit unseren Ergebnissen verglichen: In unseren Experimenten hemmte Metyrapon wie erwartet die Corticosteron- und Aldosteron-stimulierte Synthese (11 $\beta$ -Hydroxylierung) von Cortisol (Abb. 71, 72), sowie auch die Pregnenolon- und Progesteron-stimulierte Cortisolbiosynthese und –freisetzung (Abb. 75 a, b), nicht aber die des Ouabains (Abb. 73, 74, 76a, b) in den jeweils vergleichbaren Experimenten.

Da Metyrapon die 11 $\beta$ -Hydroxylierung hemmt, nicht aber die Ausbildung einer 11 $\alpha$ -Hydroxylgruppe, finden wir keinen Hinweis darauf, dass eine 11 $\beta$ -Hydroxylase an der Synthese des endogenen Ouabain beteiligt ist. Demzufolge kann das in Rindernebennieren nachgewiesene Ouabain keine 11-Hydroxygruppe in  $\beta$ -Position enthalten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die 11-Hydroxygruppe in  $\alpha$ -Position angeordnet ist, was die Annahme von Schneider et al. [13] unterstützt.

Im Falle des Cortisols muss die Blockade an früheren Vorläufern des Biosyntheseweges wirken. Folglich besteht aus den eigenen Untersuchungen heraus kein Grund zu der Annahme, dass das bei der Biosynthese in der Nebenniere des Rindes entstehende Ouabain ein Struktur-Isomer (11 $\beta$ -Hydroxygruppe) ist. Die Daten besagen, dass auch das in der Nebennierenrinde aus Cholesterol und anderen Vorläufern gebildete Ouabain identisch mit dem pflanzlichen Ouabain ist, also eine 11 $\alpha$ -Hydroxygruppe enthält (Abb. 3).

## **8.8. Vergleich der Wirkung von Ouabain und seinen direkten Strukturverwandten auf die Cortisol-Produktion**

Ouabain wird unter Kreislaufstress bei Mensch, Hund und Ratte [216] rasch ins Blut abgegeben. Da unter gleichen Bedingungen auch Cortisol ins Blut freigesetzt wird, war es naheliegend zu untersuchen, ob Herzglykoside die Freisetzung des Cortisols beeinflussen.

Wang et al. [131] fanden an Nebennierenrindenzellen der Ratte eine Hemmung der Corticosteron-Produktion durch Digoxin und Digitoxin, nicht aber durch Ouabain. Es schien denkbar, über solche Studien auch Hinweise auf Biosynthesestufen des Ouabains zu bekommen.

Wir versuchten also zu erfahren, ob Digitoxigenin ein naher Strukturverwandter von Ouabain, (vgl. Abb. 77) einen ähnlichen Effekt auf die Cortisolbiosynthese bzw. –freisetzung ausübt wie Ouabain selbst.

Wir fanden, dass 1 $\mu$ M Digitoxigenin die Cortisolfreisetzung von Nebennierenzellen in Gewebekultur stimulierte (Abb. 82a), nicht aber Ouabain in gleicher Konzentration (Abb. 78,

79). Das Aglykon Digitoxigenin stimulierte die Cortisolfreisetzung um 50% (Abb. 82a), das Herzglykosid Ouabain dagegen nicht messbar (Abb. 78). Ouabain hemmte allerdings die ACTH-stimulierte Cortisolfreisetzung (Abb. 78, 79).

Die Dissoziationskonstanten des Herzglykosid-Rezeptorkomplexes der Natriumpumpe des Rindes sind mit  $1,56 \times 10^{-8}$  M für Digitoxigenin und  $1,35 \times 10^{-8}$  M für Ouabain beinahe identisch [225]. Wenn sich ihre Wirkung auf die Cortisolsekretion dennoch deutlich unterscheiden, scheinen diese konträr ausgerichteten Effekte über einen anderen Mechanismus als den der Hemmung der Natriumpumpe zustande zu kommen.

Bei 100  $\mu$ M Konzentration von Digitoxigenin war eine Hemmung der Cortisolfreisetzung messbar (Abb. 82a). Dagegen hemmten Ouabain und Digoxin schon ab einer Konzentration von 0,1 nM die ACTH-stimulierte Cortisolsekretion und -biosynthese (Abb. 80a, b und Abb. 81a, b); Digoxin wirkte dabei geringgradig effektiver als Ouabain. Diese *in-vitro* Hemmkonzentration liegt innerhalb der therapeutischen Konzentration von Digitoxin, die 1-nanomolar beträgt [226], ähnlich wie die des Ouabains [227].

Somit muss man annehmen, dass diese Hemmung der Cortisolsekretion und -biosynthese durch Ouabain und Digoxin auch *in-vivo* auftritt, insbesondere dann, wenn Ouabain bei Kreislaufstress ins Blut ausgeschüttet wird [216]. Diese Beobachtung einer Hemmung der Cortisolfreisetzung von Digoxin *in-vitro* durch sehr niedrige Konzentrationen hat somit voraussichtlich eine physiologische, therapeutische und medizinische Relevanz.

Die Frage, weshalb Ouabain und Digoxin die ACTH-stimulierte Cortisolfreisetzung hemmen, Digitoxigenin aber stimuliert (Abb. 82a, b), obwohl sie mit fast gleicher Affinität an den Herzglykosidrezeptor der Natriumpumpe binden, ist derzeit nicht sicher zu beantworten. Die Antwort kann in der unterschiedlichen Struktur und der damit korrelierenden unterschiedlichen Hydrophobizität gesucht werden. Es ist bekannt, dass die Bindung des Herzglykosid-Rezeptorkomplexes der Natriumpumpe mit den Glykosiden der Herzglykoside wesentlich stabiler ist als die mit den Aglykonen [228]. Die durch das Aglykon erzielte stärkere Stimulierung der Cortisolfreisetzung könnte auf diesem Unterschied beruhen. Das würde eventuell bedeuten, dass Digitoxigenin leichter und ohne Hemmung der Natriumpumpe intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, wenn es an den Herzglykosid-Rezeptor der Natriumpumpe andockt.

Erste eigene Messungen, mit denen die halbmaximale Hemmung der Natriumpumpe der Nebennierenrindenzellen des Rindes durch Ouabain bestimmt wurde, ergaben einen  $K_i$ -Wert

von  $5 \times 10^{-7}$  M Ouabain. Der bei  $10^{-10}$  M Ouabain und Digoxin gemessene Effekt einer Hemmung der ACTH-stimulierten Cortisolsekretion kann demnach nicht über die Hemmung der Natriumpumpe zustande kommen. Die Arbeitsgruppen Xie und Askari [5] sowie auch Schoner, Scheiner-Bobis und Saunders [7] fanden, dass ein Andocken des Ouabains an den Herzglykosid-Rezeptor für eine Hemmung der Natriumpumpe zum Auslösen der intrazellulären Signalkaskade ausreichend ist. Hieraus lässt sich ein analoger Wirkungsmechanismus vermuten.

Zusammenfassend ist die Frage danach, ob Herzglykoside in physiologischen Konzentrationen die Sekretion von Cortisol aus Rinder-Nebennierenrindenzellen beeinflussen können, eindeutig mit ja zu beantworten. Wie es allerdings zu der Hemmung der Freisetzung des Hormons Cortisol kommt, ist derzeit noch unklar.

## 8.9. Ausblick

Die vergleichende Untersuchung der Cortisol- und Ouabainfreisetzung aus primären Nebennierenrindenzellen in Kultur erwies sich als ein wichtiges Hilfsmittel, um abzuschätzen, ob die in dieser Arbeit verwendeten Nebennieren funktionell intakt waren. Dieser Vergleich hat zu der Beobachtung geführt, dass die Sekretion des Steroidhormones Cortisol durch verschiedene Herzglykoside stimuliert, die ACTH-stimulierte Sekretion dagegen gehemmt wird. Sollte diese Beobachtung auch für den therapeutisch angewandten Konzentrationsbereich der Herzglykoside zutreffen, dann wäre eine zukunftsweisende neue Blickrichtung im Verständnis der Wirkungsweise des neuen Steroidhormons Ouabain, das in der Nebenniere gebildet wird, eröffnet. Es wäre wichtig zu erfahren, wie es mit der Steuerung der Cortisolfreisetzung durch andere Hormone interferiert, beispielsweise ob der Ouabain-Antagonist PST 2238 die Herzglykosid-stimulierte Cortisolfreisetzung unterbindet.

Über einen Einfluss zumeist unphysiologisch hoher Herzglykosid-Konzentrationen auf die Sekretion von Nebennierenrindenhormonen ist bereits früher berichtet worden: So hemmt Ouabain die Aldosteronsekretion [229]; Digitalis die Progesteron- [130], Testosteron die Aldosteron-Produktion [230] und Digoxin die Testosteron-Sekretion [231]. Offensichtlich beeinflussen sich Steroidhormone in ihrer Sekretion gegenseitig.

Da Ouabain im Gegensatz zu Digoxin und Digitoxin einen hypertensiven Effekt an Ratten auslöst [28], stellt sich die Frage, welche Molekülstruktur der verschiedenen Herzglykoside für die Cortisolfreisetzung essentiell ist, welche Konzentrationen für eine messbare Stimulation von Cortisol notwendig sind und welche intrazellulären Veränderungen der Signalkaskaden mit den gemessenen Effekten einhergehen.

Ob über diesen indirekten Weg der Messung der gegenseitigen steroidogenen Beeinflussung auch Einsichten über Vorläufer der Ouabainsynthese erarbeitet werden können, muss weitergehend untersucht werden. In jedem Fall aber verspricht dieser neue Versuchsansatz ein großes Studienfeld neuer Erkenntnisse zur Regulation der Steroidogenese.

Die Verknüpfung von Informationen über die Regulationen der Cortisol-/Aldosteron-Steroidogenese in Nebennierenrindenzellen mit ihrer Ouabainbiosynthese und -freisetzung sowie die Kenntnis über das Maß an Vergleichbarkeit zwischen *in-vitro*-Systemen mit *in-vivo*-Verhältnissen wird langfristig für die Pathogenese und Therapie von Erkrankungen, die mit Bluthochdruck und Veränderungen des Mineralo- und Glucocorticoid-Haushaltes in Zusammenhang stehen, von großer Bedeutung sein. Die weitere Erforschung dieser „neuen“ endogenen Herzglykoside ist daher von großem Interesse.

## 9. Zusammenfassung

Ouabain, ein vor 200 Jahren als afrikanisches Pfeilgift entdecktes herzaktives Steroid, ist ein neues Steroidhormon der Nebenniere. Es ist kaum etwas darüber bekannt, wie Herzglykoside in der Nebenniere synthetisiert werden und wie sie auf die Sekretion anderer Steroidhormone wie z.B. die des Cortisols einwirken. Bei der Untersuchung dieser Fragen wurden folgende Resultate erzielt:

1. Es wurde ein System zur Kultivierung primärer Nebennierenrindenzellen (NNRZ) des Rindes etabliert. Die Zellen wurden dabei auf ihre Fähigkeit Ouabain und Cortisol zu sezernieren untersucht. Andere Zellen wie primäre Nebennierenmarkzellen des Rindes, Zellen der PC12-Zelllinie und auch Suspensionskulturen der Nebennierenrindenzellen eigneten sich nicht für die geplanten Untersuchungen.
2. Es wurden die basalen und stimulierten bzw. inhibierten Sekretionsraten von Cortisol und Ouabain in den Experimenten verglichen. NNRZ sezernieren innerhalb von vier Stunden in Kultur 900.000-fach mehr an Cortisol als an Ouabain. Die Gehalte beider Steroide wurden in den Zellüberständen und intrazellulär mit einem ELISA gemessen. Die Ouabainsekretion lag im Bereich von  $1 \text{ pmol/mg Protein} \times \text{Std.}^{-1}$ . ACTH ( $1 \mu\text{M}$ ) stimulierte die Ouabainfreisetzung um den Faktor 1,9; Angiotensin II ( $100 \text{ nM}$ ) und Phenylephrin ( $10 \mu\text{M}$ ) hatten keinen Einfluss auf die Ouabainsekretion. Die Gewebekonzentrationen an Ouabain ließen sich nur nach Frieren/Tauen der Zellen verbunden mit einer Ultraschallbehandlung bestimmen. Wir fanden dabei eine deutliche Erhöhung der intrazellulären Gehalte unter ACTH- und Pregnenolon-Einfluss. Entgegen bisher publizierter Behauptungen fanden wir eindeutig keine stimulierende Wirkung des Angiotensin II auf die Ouabainbiosynthese und -freisetzung und nur eine geringgradige Stimulation des Cortisols.
3. Es wurde vergleichend untersucht, ob aus Progesteron und Pregnenolon Ouabain und Cortisol gebildet werden können. Die beiden Steroidhormone Pregnenolon und Progesteron sind Vorläufer sowohl des Cortisols, dessen Synthese sich durch Metyrapon, einen Hemmstoff der  $11\beta$ -Hydroxylase, hemmen ließ als auch des Ouabains. Die Aufnahme und Verwertung für die Biosynthese von Cortisol erfolgte nach einer Sättigungskinetik mit der halbmaximalen Sättigung im Bereich von  $14\text{--}18 \mu\text{M}$  Pregnenolon bzw. Progesteron. Die Ouabainsynthese wurde in



Gegenwart von Pregnenolon besser als durch Progesteron stimuliert. Corticosteron und Aldosteron sind keine Vorläufer der Ouabainsynthese. Metyrapon hat keine Wirkung auf die Ouabainbiosynthese aus Vorläufer-Steroiden. Die 11-Hydroxygruppe des Ouabains ist somit wie im pflanzlichen Wirkstoff  $\alpha$ -ständig.

4. Es wurde untersucht, ob Digitoxigenin ein Vorläufer des Ouabains ist. Die Frage konnte durch direkte Stimulation der Ouabainbiosynthese bzw. -freisetzung nicht geklärt werden, da die Ouabain-Antikörper mit Digitoxigenin kreuzreagierten. Es fand sich jedoch bei der vergleichenden Untersuchung der Cortisolspiegel eine 50-fache Stimulierung der Cortisolfreisetzung durch Digitoxigenin ( $1\mu\text{M}$ ). Ouabain und Digoxin hemmten dagegen die ACTH-stimulierte Cortisolausschüttung in nanomolaren Konzentrationen. Es wird vermutet, dass NNRZ in Gegenwart physiologischer (nanomolarer) Konzentrationen der beiden Herzglykoside unter Kreislauf-Stress-Bedingungen mit der Cortisolfreisetzung interferieren.

## 10. Summary

Ouabain is a new steroid hormone of the adrenal gland, which was discovered about two centuries ago as an african arrow poison. There is not much known about its biosynthesis in the adrenal gland and how it affects the secretion of other steroidhormones, i.e. cortisol. Our studies resultes in the following:

1. We established a system for cultivation of bovine primary adrenal cells. These cells are able to release ouabain and cortisol. Adrenal medulla cells, cells of the PC12-cell-line and a human adrenocortical cell-line were inappropriate.
2. We compared the secretion rates of cortisol and ouabain: Primary cultures of adrenocortical cells produced 900.000-times more of cortisol than of ouabain ( $1 \text{ pmol/mg protein} \times \text{h}^{-1}$ ). Both steroidhormones were detected by an competitive immuno assay. ACTH ( $1 \mu\text{M}$ ) increased ouabain release (factor 1.9) whereas angiotensin II ( $100 \text{ nM}$ ) and phenylephrine ( $10 \mu\text{M}$ ) had no influence. To measure intracellular ouabain cells had to be frozen first and then sonicated. Using this method we found an increase of the intracellular ouabain content after ACTH-stimulation, and under exposure to pregnenolone or progesterone.
3. We tested wether ouabain and cortisol use progesteron or pregnenolon as precursors. Both steroids enhanced cortisol and ouabain biosynthesis in a saturable manner. Half-maximal velocity was found at  $14$  and  $18 \mu\text{M}$  pregnenolon and progesteron, respectively. This is consistent with the assumption of others. Corticosterone and aldosterone are no precursor of the biosynthesis of ouabain. Metyrapone, an inhibitor of  $11\beta$ -hydroxylase, was an inhibitor of the biosynthesis of cortisol but not of ouabain. Strengthening thus the argument that ouabain in mammals has an  $\alpha$  11-hydroxygroup like in plants.
4. Trials to reveal whether digitoxigenin is converted to ouabain were not successful since the compound interacted with the antibody used for the ELISA. Digitoxigenin however stimulated cortisol release 50 times. In contrast ouabain and digoxin inhibited the activation of cortisol-release by ACTH at nanomolar concentrations suggesting that such concentrations may regulate cortisol release *in-vivo* under conditions of stress by exercise.

## 11. Literaturverzeichnis

1. Stuhlemmer, U. u. K., W. (1996) Cardenolide formation and activity of pregnane-modifying enzymes in cell suspension cultures, shoot cultures and leaves of *Digitalis lanata*, *Plant Physiol Biochem.* 34, 85-91.
2. Schneider, G. (1985) Herzwirksame Glykoside in Pharmazeutische Biologie pp. 247-264, Thieme-Verlag.
3. Lichtstein, D., Steinitz, M., Gati, I., Samuelov, S., Deutsch, J. & Orly, J. (1998a) Biosynthesis of digitalis-compound in rat adrenal cells: hydroxycholesterol as a precursor, *Life Sci.* 62, 2109-2126.
4. Perrin, A., Brasmes, B., Chambaz, E. M. & Defaye, G. (1997) Bovine adrenocortical cells in culture synthesize an ouabain-like compound, *Molec. Cell. Endocrinol.* 126, 7-15.
5. Xie, Z. & Askari, A. (2002)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase as a signal inducer, *Eur. J. Biochem.* 269, 2434-2439.
6. Xie, Z., Cai, T. (2003)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function, *Eur. J. Biochem.* 269, 2434-2439.
7. Scheiner-Bobis, G. & Schoner, W. (2001) A fresh facet for ouabain action, *Nature Medicine.* 7, 1288-1289.
8. Kristić, R. V. (1984) *Illustrated Histology of the Mammal*, Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, Tokyo.
9. Gärtner, D. E., Keilholz, W. & Seitz, H.-U. (1994) Purification, characterization and partial peptide microsequencing of progesterone 5 beta-reductase from shoot cultures of *Digitalis purpurea*, *Eur. J. Biochem.* 225, 1125-1132.
10. Hamlyn, J. M., Lu, Z., Manunta, P., Ludens, J. H., Kimura, K., Shah, J. R., Laredo, J., Hamilton, J. P., Hamilton, M. J. & Hamilton, B. P. (1998) Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain, *Clin. & Exptl. Hypertens.* 20, 523-533.
11. Withering, W. (1785) *An account on the foxglove, and some of its medical uses with practical remark on dropsy and other diseases*, G.G.J. and J. Robinson, London.

12. Szent-Györgyi, A. (1953) Chemical physiology of contraction in body and heart muscle, Academic Press, 86-91.
13. Schneider, R., Wray, V., Nimtz, M., Lehmann, W. D., Kirch, U., Antolovic, R. & Schoner, W. (1998) Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump, J Biol Chem. 273, 784-92.
14. Manunta, P., Stella, P., Rivera, R., Ciurlino, D., Cusi, D., Ferrandi, M., Hamlyn, J. M. & Bianchi, G. (1999) Left ventricular mass, stroke volume and ouabain-like factor in essential hypertension, Hypertension. 34, 450-456.
15. Schoner, W. (2000) Ouabain, a new steroid hormone of adrenal gland and hypothalamus, Exptl. Clin. Endocrinol. Diabetes. 108, 449-454.
16. Greef, K. & Wirth, K. E. (1981) Pharmakokinetics of strophanthin glycosides, Handbook of Experimental Pharmacology. 56/II, 57-85.
17. Blaustein, M. P. (1993) Physiological effects of endogenous ouabain: Control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and cell responsiveness, Am J. Physiol. 264 (Cell Physiol. 33), C1367-C1387.
18. Skou, J. C. (1986) William-Withering-The man and his work in Cardiac Glycosides 1785-1985 (Erdmann, E., Greef, K. and Skou, J.C., ed).
19. Deutsches Kolonial-Lexikon (1920), Band III, p. 49.
20. Siperstein, M. D., Murray, A.W., Titus, E. (1957) Biosynthesis of cardiotonic steroids from cholesterol in the toad Bufo Marinus, Arch Biochem Biophys. 67, 154-160.
21. Ringer, S. (1885) Regarding the influence of the organic constituents of the blood on the contractility of the ventricle, J. Physiology. 6, 361-381.
22. Schatzmann, H. J. (1953) Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran, Helv. Physiol. Pharmacol. Acta. 11, 346-354.
23. Dahl, L. K., Knudsen, K. D. & Iwai, J. (1969) Humoral transmission of hypertension: evidence from parabiosis, Circ. Res. 24, Supp. I, I-21-I-33.

24. Hamlyn, J. M., Ringel, R., Schaeffer, J., Levinson, P. D., Hamilton, B. P., Kowarski, A. A. & Blaustein, M. P. (1982) A circulating inhibitor of (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)-ATPase associated with essential hypertension, *Nature*. 300, 650-652.
  
25. Hamlyn, J. M., Blaustein, M. P., Bova, S., DuCharme, D. W., Mandel, F., Mathews, W. R. & Ludens, J. H. (1991) Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*. 88, 6259-6263.
  
26. Kawamura, A., Guo, J., Itagaki, Y., Bell, C., Wang, Y., Hauptert, J., Garner T., Magil, S., Gallagher, R. T., Berova, N. & Nakanishi, K. (1999) On the structure of endogenous ouabain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96, 6654-6659.
  
27. Schoner, W. (2002) Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones, *Eur. J. Biochem*. 269, 2440-2448.
  
28. Manunta, P., Hamilton, J., Rogowski, A. C., Hamilton, B. P. & Hamlyn, J. M. (2000) Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: Antihypertensive effect of digoxin and digitoxin, *Hypertens. Res*. 23, S77-S85.
  
29. Fedorova, O. V., Doris, P. A. & Bagrov, A. Y. (1998) Endogenous marinobufagenin-like factor in acute volume expansion, *Clin. & Exptl. Hypertension*. 20, 581-591.
  
30. Lichtstein, D., Gati, J. & Ovadia, H. (1993) Digitalis-like compounds in the toad *Bufo viridis*: Interactions with plasma., *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 22, S102-S105.
  
31. Lichtstein, D., Gati, I., Samuelov, S., Berson, D., Rozeman, Y., Landau, L. & Deutsch, J. (1993) Identification of digitalis-like compounds in human cataractous lenses, *Eur. J. Biochem*. 216, 261-268.
  
32. Lichtstein, D., Levy, T., Deutsch, J., Steinitz, M., Zigler, J. S., Jr. & Russel, P. (1999) The effects of digitalis-like compounds on rat lenses, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 40, 407-413.
  
33. Komiyama, Y., Nishimura, N., Munakata, M., Mori, T., Okuda, K., Nishino, N., Hirose, S., Kosaka, C., Masuda, M. & Takahashi, H. (2001) Identification of endogenous ouabain in culture supernatant of PC12-cells, *J. Hypertens*. 19, 229-236.

34. Ludens, J. H., Clark, M. A., Robinson, G. F. & DuCharme, D. W. (1992) Rat adrenal cortex is a source of a circulating ouabainlike compound, *Hypertension*. 19, 721-724.
35. Masugi, F., Ogihara, T., Hasegawa, T., Tomii, A., Nagano, M., Higashimori, K., Kumahara, K., Terano, Y. (1986) Circulating factor with ouabain-like immunoreactivity in patients with primary aldosteronism, *Biochem Biophys Res Commun*. 135.
36. Kitano, S., Morimoto, S., Nishibe, A., Fukuo, K., Hirotani, A., Nakahashi, T., Ysuda, O. & Ogihara, T. (1998) Exogenous ouabain is accumulated in the adrenals and mimics the kinetics of endogenous digitalis-like factor in rats, *Hypertens. Res*. 21, 47-56.
37. Eaton, D. L. u. K., C.D. (1978) Carrier-mediated transport of ouabain in isolated hepatocytes, *J Pharmacol Exp Ther*. 205.
38. Stacey, N. H. u. K., C.D. (1979) Uptake of ouabain by isolated hepatocytes from livers of developing rats, *J Pharmacol Exp Ther*. 211, 360-363.
39. Stacey, N. H. u. K., C.D. (1981) Uptake of galactose, ouabain and taurocholate into centrilobular and periportal enriched hepatocyte subpopulations, *J Pharmacol Exp Ther*. 216, 634-639.
40. Schwenk, M., Wiedmann, T., Remmer, H. (1981) Uptake, accumulation and release of ouabain by isolated rat hepatocytes, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 316, 304-4.
41. Petzinger, E. u. F., K. (1985) Transport functions of the liver. Lack of correlation between hepatocellular ouabain uptake and binding to  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, *Biochim Biophys Acta*. 815, 334-340.
42. Sagnella, G. A. u. M., G.A. (1984) Characteristics of Na/K-ATPase inhibitors in extracts of tea, *Am J Clin Nutr*. 40, 36-41.
43. Hansen, O. (1994) Do putative endogenous digitalis-like factors have a physiological role? *Hypertension*. 24, 640-4.
44. Lewis, L. K., Yandle, T.G., Lewis, J.G., Richards, A.M., Pidgeon, G.B., Kaaja, R.J., Nicholls, M.G. (1994) Ouabain is not detectable in human plasma, *Hypertension*. 24.

45. Naruse, K., Naruse, M., Tanabe, A., Yoshimoto, T., Watanabe, Y., Kurimoto, F., Horiba, N., Tamura, M., Inagami, T., Demura, H. (1994) Does plasma immunoreactive ouabain originate from the adrenal gland? *Hypertension* 23. (1 Suppl.), I102-I105.
46. Doris, P. A., Hayward-Lester, A., Bourne, D. & Stocco, D. M. (1996) Ouabain production by cultured adrenal cells, *Endocrinology*. 137, 533-539.
47. Butt, A. N., Semra, Y. K., Lane, S. J., Lee, T. & Swaminathan, R. (1998) Endogenous ouabain secretion in man is not regulated by ACTH, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 66, 151-157.
48. Gomez-Sanchez, E. P. (1994) Hypertension and the mineralocorticoid receptor in the brain, *Ann N Y Acad Sci.* 30, 415-7.
49. Qazzaz, H. M., El-Masri, M. A. & Valdes, R. J. (2000) Secretion of a lactone-hydrogenated ouabain-like effector of sodium, potassium-adenosine triphosphatase activity by adrenal cells, *Endocrinology*. 141, 3200-3209.
50. Laredo, J., Hamilton, B. P. & Hamlyn, J. M. (1994) Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells, *Endocrinology*. 135, 794-797.
51. Vinge, E., Erfurth, E.M.T., Lundin, S. (1993) Effects of adrenal function tests on the levels of endogenous digitalis-like substances and some pituitary hormones, *Acta Endocrinologica*. 128, 29-34.
52. Boulanger, B. R., Lilly, M. P., Hamlyn, J. M., Laredo, J., Shurtleff, D. & Gann, D. S. (1993) Ouabain is secreted by the adrenal gland of the awake dogs, *Am. J. Physiol.* 264, E413-E419.
53. Laredo, J., Hamilton, J. P. & Hamlyn, J. M. (1995) Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cells. Role of zona glomerulosa and zona fasciculata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 487-493.
54. Hilton, P. J., White, R. W., Lord, G. A., Garner, G. V., Gordon, D. B., Hilton, M. J., Forni, L. G., McKinnon, W., Ismail, F. M., Keenan, M., Jones, K. & Morden, W. E. (1996) An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta, *The Lancet*. 348, 303-305.
55. Sich, B., Kirch, U., Tepel, M., Ziedek, W. & Schoner, W. (1996) Pulse pressure correlates with a proscillaridin A immunoreactive compound, *Hypertension*. 27, 1073-1078.

56. Qazzaz, H. M. A. M., Goudy, S. L. & Valdes, R. J. (1996) Deglycosylated products of endogenous digoxin-like immunoreactive factor in mammalian tissue, *J. Biol. Chem.* 271, 8731-8737.
57. Qazzaz, H. M. A. M., Jortani, S. A., Poole, J. M. & Valdes, R. J. (1996) Evidence for the presence of a reduced form of digoxin-like immunoreactive factor (dihydro-DLIF) in mammalian tissues, *Clin. Chem.* 42, 1092-1099.
58. Goto, A. & Yamada, K. (1998) Ouabain-like factor, *curr. Opinion Nephrol. Hypertens.* 7, 189-196.
59. Li, S.-Q., Eim, C., Kirch, U., Lang, R. E. & Schoner, W. (1998a) Bovine adrenals and hypothalamus are a major source of proscillaridin A- and ouabain-immunoreactivities, *Life Sci.* 62, 1023-1033.
60. Repke, K. R., Weiland, J., Menke, K.H. (1991) Chemical models for the chemical nature of endogenous digitalis, *J Enzyme Inhib.* 5, 25-32.
61. Hamilton, B. P., Manunta, M.D., Laredo, J., Hamilton, B.S., Hamlyn, J.M. (1994) The new adrenal steroid hormone ouabain, *Current opinion in endocrinology and diabetes*, 123-131.
62. Steyn, P. S. u. v. H., F.R. (1998) Bufadienolides of plant and animal origin, *Nat Prod Rep.* 15, 397-413.
63. Hamlyn, J. M., Laredo, J., Shah, J.R., Lu, Z.R., Hamilton, B.P. (2003) 11-Hydroxylation in the Biosynthesis of Endogenous Ouabain: Multiple Implications, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 986, 685-693.
64. Manunta, P., Hamilton, B. P. & Hamlyn, J. M. (2001) Structure-Activity Relationship for hypertensinogenic activity of ouabain. Role of the sugar and lactone ring, *Hypertension.* 37, 472-477.
65. Schoner, W. (1993) Endogenous digitalis-like factors, *Progress in Drug Reserach.* 41, 249-291.
66. Anderson, L. A., Joubert, J.P., Schultz, R.A., Kellerman, T.S., Pienaar, B.J. (1987) Experimental evidence that the active principle of the poisonous plant *Thesium lineatum* L.f. (Santalaceae) is a bufadienolide, *Onderstepoort J Vet Res.* 54, 645-650.
67. McKenzie, R. A., Franke, F.P., Dunster, P.J. (1987) The toxicity to cattle and bufadienolide content of six *Bryophyllum* species, *Aust Vet.* 64, 298-301.



68. Wendroth, S. u. S., H.U. (1990) Characterization and localization of progesterone 5 $\alpha$ -reductase form cell cultures of foxglove (*Digitalis lanata* Ehrh.), *Biochem J.* 266, 41-46.
69. Stuhlemmer, U. H., W., Milek, F., Kreis, W. (1993a) 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid 5 $\beta$ -oxidoreductase in tussui cultures of *Digitalis lanata*.Z., *Naturforsch.* 48c, 713-721.
70. Lichtstein, D., Gati, I., Babila, T., Haver, E. & Katz, U. (1991) Effect of salt acclimation on digitalis-like compounds in the toad, *Biochim Biophys Acta.* 1073, 65-8.
71. Flier, J., Edwards, M.W., Daly, J.W., Myers, C.W. (1980) Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, *Science.* 208, 503-5.
72. Butler, V. P. J., Morris, J.F., Akizawa, T., Matsukawa, M., Keating, P., Hardar,t A., Furman, I. (1996) heterogeneity and lability of endogenous digitalis-like substances in the plasma of the toad, *Bufo marinus*, *Am J Physiol Cell Physiol.* 271, T325-32.
73. Garraffo, H. M. u. G., E.G. (1986) Biosynthesis of bufadienolides in toads. VI. Experiments with [1,2-3H]cholesterol, [21-14C]coprostanol, and 5 beta-[21-14C]preganolone in the toad *bufo arenarum*, *Steroids.* 48, 251-7.
74. Brubacher, J. R., Lachmanen, D., Ravikumar, P.R., Hoffman, R.S. (1999) Efficacy of digoxin specific Fab fragments (Digibind) in the treatment of toad venom poisoning, *Toxicon.* 37, 931-42.
75. Porto, A. M. u. G., E.G. (1971) Biosynthesis of the bufadienolide marinobufagin in toads *bufo paracnemis* from cholesterol-20-14C, *Experientia.* 27, 506.
76. Eggenberger, F. u. R.-R., M. (1993) Production of cardenolides in different life stages of the chrysomelid beetle *Oreina gloriosa*, *J Insect Physiol.* 39, 751-759.
77. Brower, L. P., Brower, J.v.Z, Corvino, J.M. (1967) Plant poisons in a terrestrial food chain, *Proc. N. A. S.* 57, 893-898.
78. Azuma, M., Sekizaki, S., Akizawa, T., Yasuhara, T., Nakajima, T. (1986) Activities of novel polyhydroxylated cardiogenic steroids purified from nuchal glands of the snake, *Rhabdophis tigrinus.*, *J Pharm Pharmacol.* 38, 388-90.

79. Kajimura, S., Hirano, T., Moriyama, S., et al. (2004) Changes in plasma concentrations of immunoreactive ouabain in the talipia in response to changing salinity, *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 90-99.
80. Gloor, S., Antonicek, H., Sweadner, K.J., Pagliusi, S., Frank, R., Moos, M. and Schachner, M. (1990) The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the beta subunit of the Na,K-ATPase, *J Cell Biol.* 110, 165-174.
81. Clausen, T. (1996) The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump in skeletal muscle: quantification, regulation and functional significance, *Acta Physiol Scand.* 156, 227-235.
82. Szekeres, L. (1996) On the mechanism and possible therapeutic application of delayed cardiac adaptation to stress, *Can J Cardiol.* 12, 177-185.
83. Sweadner, K. J. (1989) Isoenzymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, *Biochim. Biophys. Acta.* 988, 185-220.
84. Arato-Oshima, T., Matsui, H., Wakizaka, A., Homareda, H. (1996) Mechanism responsible for oligomycin-induced occlusion of Na<sup>+</sup> within Na/K-ATPase, *J Biol Chem.* 271, 25604-25610.
85. Homareda, H., Ishii, T., Takeyasu, K. (2000) Binding domain of oligomycin on Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, *Eur J Pharmacol.* 400, 177-183.
86. Mercer, R. W. (1993) Structure of the Na,K-ATPase, *Int Rev Cytol.* 137C, 139-168.
87. Jewell, E. A., Shamraj, O. L. & Lingrel, J. B. (1992) Isoforms of the a subunit of Na,K-ATPase and their significance, *Acta Physiol. Scand.* 146, 161-169.
88. Takeyasu, K., Lemas, V., Fambrough, D.M. (1990) Stability of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase alpha-subunit isoforms in evolution, *Am J Physiol.* 259, C619-630.
89. Pressley, T. A. (1992) Phylogenetic conservation of isoform-specific regions within a-subunit of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, *Am J Physiol.* 262, C743-C751.
90. Juhaszova, M. & Blaustein, M. P. (1997) Na<sup>+</sup> pump low and high ouabain affinity a subunit isoforms are differently distributed in cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 1800-1805.

91. Ewart, H. S. & Klip, A. (1995) Hormonal regulation of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: Mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity, *Am. J. Physiol.* 269, C295-311.
92. Fambrough, D. M., Lemas, M.V., Hamrick, M., Emerick, M., Renaud, K.J., Inman, E.M., Hwang, B., Takeyasu, K. (1994) Analysis of subunit assembly of the Na-K-ATPase, *Am J Physiol.* 266, C579-C589.
93. McDonough, A. A., Azuma, K.K., Lescale-Matys, L., Tang, M-J., Nakhoul, F., Hensley, C.B., Komatsu, Y. (1992) Physiological rationale for multiple sodium pump isoforms. Differential regulation of  $\alpha_1$  vs  $\alpha_2$  by ionic stimuli, *Ann NY Acad Sci.* 671, 156-169.
94. K., G. (1991) Posttranslational modifications and intracellular transport of sodium pumps: importance of subunit assembly. In: *The sodium pump: structure, mechanism and regulation.* in The Rockefeller University Press, New York (Kaplan J.H., D. W. P., eds, ed) pp. 31-43.
95. Therien, A. G., Goldshleger, R., Karlsh, S.J.D., Blostein, R. (1997) Tissue-specific distribution and modulatory role of the g subunit of the Na,K-ATPase, *J Biol Chem.* 272, 32628-32634.
96. Therien, A. G., Karlsh, S.J.D., Blostein, R. (1999) Expression and functional role of the g subunit of the Na,K-ATPase in mammalian cells, *J Biol Chem.* 274, 12252-12256.
97. Therien, A. T. u. B., R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation, *Am J Physiol.* 279, C541-C566.
98. Blaustein, M. P., Juhaszowa, M. & Golovina, V. A. (1998) The cellular mechanism of action of cardiotonic steroids: A new hypothesis, *Clin. and Exper. Hypertens.* 20, 691-703.
99. Xie, Z., Cai, T. (2003) Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-mediated signal transduction: From protein interaction to cellular function, *Eur.J.Biochem.* 269, 2434-2439.
100. Haas, M. A., A., Xie, Z. (2000) Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal transducing function of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, *J.Biol.Chem.* 275, 27832-27837.
101. Liu, J., Tian, J., Haas, M., Shapiro, J.I., Askari, A., Xie., Z. (2000) Ouabain interaction with cardiac Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations, *J. Biol. Chem.* 275, 27832-27837.

102. Huang, L., Kometiani, P. & Xie, Z. (1997) Differential Regulation of Na/K-ATPase alpha-subunit isoform gene expressions in cardiac myocytes by ouabain and other hypertrophic stimuli, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 3157-3167.
103. Kometiani, P., Li, J., Gnudi, L., Kahn, B., Askari, A. & Xie, Z. (1998) Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases, *J. Biol. Chem.* 273, 15249-15256.
104. Mohammadi, K., Kometiani, P., Xie, Z., et al. (2001) Role of Protein kinase C in the signal pathways that link Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase to ERK1/2, *J.Biol.Chem.* 276, 42050-42056.
105. Aizman, O., Uhlén, P., Lal, M., Brismar, H. & Aperia, A. (2001) Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 98, 13420-13424.
106. Miyakawa-Naito, A., Uhlén, P., Lal, M., Aizman, O., Mikoshiba, K., Brismar, H., Zelenin, S. & Aperia, A. (2003) Cell signaling microdomain with Na,K-ATPase and inositol 1,4,5-triphosphate receptor generates calcium oscillations, *J. Biol. Chem.* 278, 50335-50361.
107. Saunders, R. & Scheiner-Bobis, G. (2004) Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump, *Eur. J. Biochem.* 271, 1054-1062.
108. Godfraind, T., Ghysel-Burton, J. (1980) Independence of the positive inotropic effect of ouabain from the inhibition of the heart Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-pump, *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*. 77, 3067-3069.
109. Arnon, A., Hamlyn, J. M. & Blaustein, M. P. (2000) Ouabain augments Ca<sup>2+</sup> transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na<sup>+</sup>, *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H679-H691.
110. Abramowitz, J., Dai, C., Hirschi, K. K., Dmitrieva, R. I., Doris, P. A., Liu, L. & Allen, J. C. (2003) Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5, *Circulation*. 108, 3048-53.
111. Aydemir-Koksoy, A. & Allen, J. C. (2001) Low concentrations of ouabain induce vascular smooth muscle cell proliferation, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 47, 341-5.

112. Golomb, E., Hill, MR, Brown, RG, et al. (1994) Ouabain enhances the mitogenic effect of serum in vascular smooth muscle cells, *Am. J. Hypertens.* 7, 69-74.
113. Dahl, L. K., Knudsen, K. D., Heine, M. & Leitzl, G. (1967) Effects of chronic excess salt ingestion. Genetic influence on the development of salt hypertension in parabiotic rats. Evidence for a circulating factor, *J. Exptl. Med.* 126, 687-699.
114. deWardener, H. E. & Clarkson, E. M. (1985) Concept of natriuretic hormone, *Physiol. Rev.* 65, 658-759.
115. Blaustein, M. P. (1977) Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: a reassessment and a hypothesis, *Am. J. Physiol.* 232, C167-C173.
116. De Wardener, H. E., Mills, I. H., Clapham, W. F. & Hayter, C. J. (1961) Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog., *Clin. Sci. Lond.* 21, 249-258.
117. Buckalew, V. M. J. u. G., K. (1984) Natriuretic Hormone, *Annu Rev Physiol.* 46, 343-358.
118. Manunta, P., Rivera, R., Ferrandi, M., D'Amico, M., Buzzzi, L., Lanzani, C., Cusi, D., Bianchi, G. (1998) Increased plasma ouabain-like factor during acute salt depletion in hypertensive patients, *J Hypertens.* 16, 17-46.
119. WangJG., S., JA., Messagio, E., et al. (2003) Salt, endogenous ouabain and blood pressure interactions in the general population, *J. Hypertens.* 1475-1481.
120. Gottlieb, S. S., Rogowski, A. C., Weinberg, M., Krichen, C. M., Hamilton, B. C. & Hamlyn, J. M. (1992) Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure, *Circulation.* 86, 420-425.
121. Schoner, W., Bauer, N., Müller-Ehmsen, J., Krämer, U., Hambarchian, N., Schwinger, R., Moeller, H., Kost, H., Weitkamp, C., Schweitzer, T., Kirch, U., Neu, H. & Grünbaum, E.-G. (2003) Ouabain as a Mammalian Hormone, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986, 678-684.
122. Goto, A., Yamada, K., Nagoshi, H., Teruya, H., Yamazato, M., Muratani, H., Sakima, A., Takishita, S., Terano, Y., Fukiyama, K. & Omata, M. (1995) Stress-induced elevation of ouabainlike compound in rat plasma and adrenal, *Hypertension.* 26, 173-176.

123. Sopucleous, A., Elmatzoglou, I., Souvatzoglou, A. (2003) Circulating endogenous digitalis-like factor(s) (EDLF) in man is derived from the adrenals and its secretion is ACTH-dependent, *J. Endocrinol. Invest.* 26, 668-674.
  
124. Yamada, K., Goto, A. & Omata, M. (1997) Adrenocorticotropin-induced hypertension in rats: Role of ouabain-like compound, *Am. J. Hypertens.* 10, 403-408.
  
125. Manunta, P., Rogowski, A. C., Hamilton, B. C. & Hamlyn, J. M. (1999) Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: Antihypertensive effect of digoxin, *International Symposium on Natriuretic and Digitalis-like Factors, Chitose, Hokkaido Japan, 24. August 1999, Abstract 13.*
  
126. Manunta P, F., M. (2004) Different effects of marinobufagenin and endogenous ouabain, *J. Hypertens.* 257, 257-259.
  
127. Pierdomenico, S. D., Bucci, A., Manunta, P., Rivera, R., Ferrandi, M., Hamlyn, J. M., Lapenna, D., Cuccurullo, F. & Mezzetti, A. (2001) Endogenous ouabain and hemodynamic and left ventricular geometric patterns in essential hypertension, *Am. J. Hypertens.* 14, 44-50.
  
128. Szalay, K. S. (1993) Ouabain- a local paracrine, aldosterone synthesis regulating hormone? *Life Sci.* 52, 1777-1780.
  
129. Dong, X. H., Komiyama, Y., Nishimura, N., Masuda, M. & Takahashi, H. (2004) Nanomolar level of ouabain increases intracellular calcium to produce nitric oxide in rat aortic endothelial cells, *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31, 276-83.
  
130. Chen, J.-J., Wang, P. S., Chien, E.-J. & Wang, S.-W. (2001) Direct inhibitory effect of digitalis on progesterone release from rat granulosa cells, *Brit. J. Pharmacol.* 132, 1761-1768.
  
131. Wang, S.-W., Pu, H.-F., Kan, S.-F., Tseng, C.-I., Lo, M.-J. & Wang, P. S. (2004) Inhibitory effects of digoxin and digitoxin on corticosterone production in rat zona fasciculata-reticularis cells, *Brit. J. Pharmacol.* 142, 1123-1130.
  
132. Schiebinger, R. J. & Santora, A. C. (1989) Stimulation by calcitonin generated peptide of atrial natriuretic peptide secretion in vitro and its mechanism of action, *Endocrinology.* 124, 2473-2479.

133. Meyer, E. M. & Cooper, J. R. (1981) Correlations between  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and acetylcholine release in rat cortical synaptosomes, *J. Neurochem.* 36, 467-475.
134. Manunta, P., Rogowski, A. C., Hamilton, B. P. & Hamlyn, J. M. (1994) Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure, *J. Hypertens.* 12, 549-560.
135. Pamnani, M. B., Chen, S., Yuan, C. M. & Haddy, F. J. (1994) Chronic blood pressure effects of bufalin, a sodium-potassium ATPase inhibitor in rats, *Hypertension.* 23, I-106-I109.
136. Veerasingham, S. J. & Leenen, F. H. (1999) Ouabain- and central sodium-induced hypertension depend on the ventral anteroventral third ventricle region, *Am. J. Physiol.* 276, H63-H70.
137. Yuan, C. M., Manunta, P., Hamlyn, J. M., Chen, S., Bohen, E., Yeun, J., Haddy, F. J. & Pamnani, M. B. (1993) Long-term ouabain administration produces hypertension in rats, *Hypertension.* 22, 178-187.
138. Adair, C. D., Buckalew, V., Taylor, K., Ernest, J. M., Frye, A. H. & Veille, J. C. (1996) Elevated endotoxin-like factor complicating a multifetal second trimester pregnancy: Treatment with digoxin-binding immunoglobulin, *Am. J. Nephrol.* 16, 529-531.
139. Goodlin, R. C. (1988) Antidigoxin antibodies in eclampsia, *New Engl. J. Med.* 318, 518-519.
140. Shamraj, O., Grupp, I. L., Grupp, G., Melvin, D., Gradoux, N., Kremers, W., Lingrel, J. & De Pover, A. (1993) Characterization of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing hearts, *Cardiovasc. Res.* 72, 2229-22237.
141. Schwinger, R., Wang, J., Frank, K., Müller-Ehmsen, J., Brixius, K., McDonough, A. A. & Erdman, E. (1999) Reduced sodium pump  $\alpha_3$  and  $\beta_1$ -isoform protein levels and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity but unchanged  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger protein levels in human heart failure, *Circulation.* 99, 2105-22237.
142. Ferrari, P., Torielli, L., Ferrandi, M., Padoani, G., Duzzi, L., Florio, M., Conti, F., Melloni, L., Vesci, L., Corsico, N. & Bianchi, G. (1998) PST 2238: A new antihypertensive compound that antagonizes the long term pressor effect of ouabain, *J. Pharmacol. Exptl. Therapeut.* 285, 83-94.

143. Quadri, L., Bianchi, G., Cerri, A., Fedrizzi, G., Ferrari, P., Gobbini, M., Melloni, P., Sputore, S. & Torri, M. (1997) 17 $\beta$ -(3Furyl)-5 $\beta$ -androsterane-3 $\beta$ -14 $\beta$ -17 $\alpha$ -triol (PST 2238). A very potent antihypertensive agent with a novel mechanism of action, *J. Med. Chem.* 40, 1561-1564.
144. Ferrari, P., Ferrandi, M., Tripoldi, G., Torielli, L., Padoani, G., Minotti, E., Melloni, E. & Bianchi, G. (1999) PST 2238: A new antihypertensive compound that modulates Na,K-ATPase in genetic hypertension, *J. Pharmacol. Exptl. Therapeutics*. 288, 1074-1083.
145. Wang, H., Huang, B. & Leenen, F. (2003) Brain sodium channel and ouabainlike compounds mediate central aldosterone-induced hypertension, *Am. J. Heart Circ. Physiol.*, H2516-H2523.
146. Huang, B. S., Ganten, D. & Leenen, F. H. H. (2001) Responses to central Na<sup>+</sup> and ouabain are attenuated in transgenic rats deficient in brain angiotensinogen, *Hypertension*. 37, 683-686.
147. Masugi, F., Ogihara, T., Hasegawa, T., Sagakuchi, K. & Kumahara, Y. (1988) Normalization of high plasma level of ouabain-like immunoreactivity in primary aldosteronism after removal of adenoma, *J. Hum. Hypertens.* 2, 17-20.
148. Shaikh, I. M., Lau, B. W. C., Siegfried, B. A. & Valdes, R. (1991) Isolation of digoxin-like immunoreactive factors from mammalian adrenal cortex, *J. Biol. Chem.* 266, 13672-13678.
149. Manunta, P., Evans, G., Hamilton, B. P., Gann, D., Resau, J. & Hamlyn, J. M. (1992) A new syndrome with elevated plasma ouabain and hypertension secondary to an adrenocortical tumor, *J. Hypertens.* 10, (Suppl. 4) S27.
150. Komiyama, Y., Nishimura, N., Munakata, M., Okuda, K., Nishino, N., Kosaka, C., Masuda, M., Mori, T., Matsuda, T. & Takahashi, H. (1999) Increases in plasma ouabainlike immunoreactivity during surgical extirpation of pheochromocytoma, *Hypertension Res.* 22, 135-139.
151. Hamlyn, J. M., Harris, D.W., Ludens, J.H. (1989) Digitalis-like activity in human plasma, *J Biol Chem.* 264, 7395-7404.
152. Ludens, J. H., Clark, M.A., DuCharme, D.W., Harris, D.W., Lutske, B.S., Mandel, F., Mathews, W.R., Sutter, D.M., and Hamlyn, J.M. Purification from human plasma of and endogenous digitalis-like factor for structural analysis. *Hypertension* 17: 923-929. (1991) Purification from human plasma of and endogenous digitalis-like factor for structural analysis, *Hypertension*. 17, 923-929.



153. Tamura, M., Lam, T.T., Inagami, T. (1988) Isolation and characterization of an specific endogenous  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inhibitor from bovine adrenal, *Biochemistry*. 27, 4244-4253.
154. Doris, P. A., Jenkins, L.A., Stocco, D.M. (1994) Is ouabain an authentic endogenous mammalian substance derived from adrenal gland? *Hypertension*. 23, 632-638.
155. Tymiak, A. A., Norman, J. A., Bolgar, M., DiDonato, G. C., Lee, H., Parker, W. L., Lo, L.-C., Berova, N., Nakanishi, K., Haber, E. & Hauptert jr., G. T. (1993) Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 90, 8189-8193.
156. Goto, A., Yamada, K., Ishii, M., Yoshioka, M., Ishiguro, T., Eguchi, C., Sugimoto, T. (1989) Existence of a polar digitalis-like factor in mammalian hypothalamus, *Biochem Biophys Res Commun*. 161, 953-8.
157. Siperstein, M. D., Murray, A.W., Titus, E. (1957) Biosynthesis of cardiotonic steroids from cholesterol in the toad *Bufo Marinus*, *Biochem Biophys*. 67, 154-160.
158. Qazzaz, H. M., Cao, Z., Bolanowski, D. D., Clark, B. J. & Valdes, R., Jr. (2004) De novo biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors, *Clin Chem*. 50, 612-20.
159. Malawista, I. u. D., E.A. (1961) Isolation and identification of Rhamnose from rabbit skin, *Nature*. 192, 871-872.
160. Hamlyn, J. M. (2004) Biosynthesis of endogenous cardiac glycosides by mammalian adrenocortical cells: three steps forward, *Clinical Chemistry*. 50, 469-470.
161. Dmitrieva, R. I., Bagrov, A.Y., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Stocco, D.M., Doris, P.A. (2000) Mammalian Bufadienolide is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage, *Hypertension*. 36, 442-448.
162. Fedorova, O. V., Anderson, D.E., Bagrov, A.Y. (1998a) Plasma marinobufagenin-like and oubain-like immunoreactivity in adrenocorticotropin-treated rats, *Am J Hypertens*. 11, 796-802.

163. Laredo, J., Shah, J. R., Hamilton, B. P. & Hamlyn, J. M. (2000) Alpha-1 adrenergic receptors stimulate secretion of endogenous ouabain from human and bovine adrenocortical cells in Na/K-ATPase and Related ATPases (Taniguchi, K. & Kayas, S., eds) pp. 671-679, Amsterdam.
  
164. Shah, J. R., Laredo, J., Hamilton, B.P., Hamlyn, J.M. (1998) Different Signaling Pathways Mediate Stimulated Secretions Of Endogenous Ouabain and Aldosterone From Bovine Adrenocortical Cells, Hypertension. 31, 463-468.
  
165. Laredo, J., Shah, J. R., Lu, Z., Hamilton, B. P. & Hamlyn, J. M. (1997) Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cortical cells via angiotensin II receptors, Hypertension. 29, 401-107.
  
166. Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signaling, Nature. 361, 315-325.
  
167. De Angelis, C. & Hauptert Jr., G. T. (1998) Hypoxia triggers release of an endogenous inhibitor of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase from midbrain and adrenal, Am. J. Physiol. 274, F182-F188.
  
168. Paci, A., Marrone, O., Lenzi, S., Prontera, C., Nicolini, G., Ciabatti, G., Ghione, S. & Bonsignore, G. (2000) Endogenous digitalislike factors in obstructive sleep apnea, Hypertens. Res. 23 Suppl., S87-S91.
  
169. Gruber, K. A., Whitaker, J.M., Buckalew, V.W., Jr. (1980) Endogenous digitalis-like substance in plasma of volume-expanded dogs, Nature. 287, 743-5.
  
170. Huang, B. S., Leenen, F.H.H. (1995) Brain "Ouabain", sodium and arterial baroreflex in spontaneously hypertensive rats, Hypertension. 25, 814-817.
  
171. Huang, B. S., Harmsen, E., Yu, H. & Leenen, F. H. H. (1992) Brain ouabain-like activity and the sympathexcitatory and pressor effects of central sodium in rats, Circ. Res. 71, 1059-1066.
  
172. Teruya, H., Yamazato, M., Muratani, H., Sakima, A., Takishita, S., Terano, Y. & Fukiyama, K. (1997) Role of ouabain-like compound in the rostral ventrolateral medulla in rats, J.Clin.Invest, 2791-2798.
  
173. Jandhyala, B. S., Ansari, A.F. (1986) Elevation of sodium levels in the cerebral ventricles of anaesthetized dogs triggers the release of an inhibitor of ouabain-sensitive sodium, potassium-ATPase into the circulation, Clin Sci (Lond). 70, 103-10.

174. Balda, B. R., Rosenzweig, D. (1986) Cyclosporin A in the treatment of pemphigus foliaceus and pemphigus erythematosus, *Hautarzt*. 37, 454-7.
175. Selye, H., Horava, A. (1953) Stress, *Tidsskr Nor Laegeforen, Korrespondanser*. 73, 195.
176. New, I. M. (1998) Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia, *Annu. Rev. Med.* 49, 311-28.
177. Tempel, T. E., Liddle, G.W. (1970) Inhibitors of adrenal steroid biosynthesis, *Annual Reviews*, 199-211.
178. Seckl, J. R., Walker, B. (2001) Minireview: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1-A Tissue-specific amplifier of glucocorticoid action, *Endocrinology*. 142, 1371-1376.
179. Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., et al. (1992) Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone, *J. Biol. Chem.* 267, 24248-24252.
180. Mizuno, T. (1970) Action of the spleen on excitation level of the brain. 2. Correlation between the spleen and hypophyseal-adrenocortical hormones on fluctuation of the excitation level of the brain of the rabbit, *Nippon Shonika Gakkai Zasshi*. 74, 928-35.
181. Thiebaut, F. T., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C. (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 84, 7735-7738.
182. Gottesman, M. M. & Pastan, I. (1988) The multidrug transporter, a double-edged sword (minireview), *Journal of Biological Chemistry*. 263, 12163-12166.
183. Karssen, A. M., Meijer, O.C., van der Sandt, J., Lucassen, P.J., de Lange, E.C.M., de Boer, A.G., de Kloet, E.R. (2001) Multidrug resistance p-Glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain, *Endocrinology*. 142, 2686-2694.
184. Asif, A. R. (2004) Role of transport systems in cortisol release from human adrenal cells, *Dissertationsschrift, Fachbereich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Georg-August-Universität, Göttingen, Germany*.

185. Sirianni, R., Rehman, K.S., Carr, B.R., Parker, C.R., Jr., Rainey, W.E. (2005) Corticotropin-releasing hormone directly stimulates cortisol and the cortisol biosynthetic pathway in human fetal adrenal cells, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 90, 279-285.
  
186. Arakane, F., Sugawar, T., Nishino, H., Liu, Z., Holt, J.A., Pains, D., Stocco, d.M., Miller, W., Strauss, J.F. (1996) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 93, 13731-13736.
  
187. Le Roy, C., Li, Y., Stocco, DM., Langlois, D., Saez, JM. ((200) Regulation by ACTH, Angiotensin II, TGF- $\beta$ , IGF I of bovine adrenal cell steroidogenic capacity and expression of ACTH receptor, *Endocrinology*, 1599-1607.
  
188. Bose, H. S., Whittal, R.M., Baldwin, M.A., Miller, W. (1999) The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 96, 7250-7255.
  
189. Le Roy, C., Li, Y., Stocco, DM., Langlois, D., Saez, JM. (2000) Regulation by ACTH, Angiotensin II, TGF- $\beta$ , IGF I of bovine adrenal cell steroidogenic capacity and expression of ACTH receptor, *Endocrinology*. 141, 1599-1607.
  
190. Cherradi, N., Rossier, MF, Vallotton, MB., Timberg, R., Friedberg, I., Orly, J., Wang, XJ., Stocco, DM., Capponi, AM. (1997) Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (Steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome P450<sub>scc</sub> and 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells, *Journal of Biological Chemistry*. 272, 7899-7907.
  
191. Young, E. A., Lopez, J.F., Murphy-Weinber, V., Watson, S.J., Akil, H. (1998) The Role of mineralocorticoid receptors in hypothalamix-pituitary-adrenal axis regulation in humans, *J. Clin. Endocrinol*. 83, 3339-3345.
  
192. DiBarolomeis, M. J., Jefcoate, C.R. (1984) Characterization of the acute stimulation of steroidogenesis in primary bovine adrenal cortical cell cultures, *The Journal of biological chemistry*. 259, 10159-10167.

193. Green, L. A., Tischler, A. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Proc.Natl. Acad. Sci.* 73, 2424-2428.
  
194. Berry, M. N., Edwards, A.M., Barrit, G.J., Grivell, M.B., Halls, H.J., Gannon, B.J., Friend, D.S. (1991) Isolated hepatocytes. Preparation, properties and applications in Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Burdon, R. H., van Knippenber, P.H., eds., ed), Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
  
195. Petzinger, E. u. S., R. (1976) Scanning electron microscopic studies on the cytolytic effect of phallolysin on isolated rat hepatocytes and AS-30D hepatoma cells, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 295, 211-213.
  
196. Kilpatrick, D. L., Ledbetter, F.H., Carson, K.A., Kirshner, A.G., Slepatis, R. and Kirshner, N. (1980) Stability of bovine adrenal medulla cells in culture, *J. Neurochem.* 35, 679-692.
  
197. Marley, P. D., Thomson, K.A., Smardenceas, A. (1993) Non-cholinergic nervous control of catecholamine secretion from perfused bovine adrenal glands, *J Physiol.* 465, 489-500.
  
198. Neumann, S. (2003) Aufnahme von endogenem Digitalis in bovine Nebennierenrindenzellen, Dissertationsschrift, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany.
  
199. Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1992) Nebenniere, Glandula suprarenalis. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band 4: Nervensystem, Sinnesorgane, endokrine Drüsen, pp. 491-496
  
200. Baur, H., Kasperek, S., Pfaff, E. (1975) Criteria of viability of isolated liver cells, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 365, 827-838.
  
201. Xu, S., Ermert, H. (1997) Modelle zur Beschreibung der Ultraschallstreuung in Blut, *Biomedizinische Technik.* 42, 123-131.
  
202. Chu, F. W., Hyatt, P.J. (1986) Purification of dispersed rat adrenal zona glomerulosa cells by Percoll density gradient centrifugation and the isolation of a population of cells highly responsive to adrenocorticotropin, *J Endocr.* 109, 351-358.
  
203. Tait, J. F., Tai, S.A.S., Gould, R.P., Mee, M.S.R. (1974) The properties of adrenal zona glomerulosa cells after purification by gravitational sedimentation, *Proc R Soc Lond B.* 185, 375-400.

204. Bradford. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72, 248-252.
205. Freshney, R. I. (1990) *Quantitative Erfassung und ihre experimentelle Realisierung.* pp.238-239, de Gruyter, Berlin, New York.
206. Harris, D. W., Clark, M. A., Fisher, J. F., Hamlyn, J. M., Kolbasa, K. P., Ludens, J. H. & Du Charme, D. W. (1991) Development of an immunoassay for endogenous digitalislike factor, *Hypertension.* 17, 936-943.
207. Sich, B. (1995) *Entwicklung eines immunologischen Testes für "endogene Herzglykoside" und Messung ihrer Konzentrationen im Plasma von Patienten,* Dissertationsschrift, Fachbereich Ernährungswissenschaften, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Germany.
208. Hornsby, P. J., O'Hare, M.J., Neville, A.M. (1974) Functional and morphological observation on rat adrenal zona glomerulosa cells in monolayer culture, *Endocrinol.* 95, 1240-1250.
209. Almazan, G., Anunis, D., Garcia, A.G., Montiel, C., Nicolas, G.P., Sanchez-Garcia, P. (1984) Effects of collagenase on the release of [3H]-noradrenaline from bovine cultured adrenal chromaffin cells, *Br J Pharmacol.* 81, 599-610.
210. Kawamura, M., Nakamichi, N., Imagawa, N., Tanaka, Y., Tomita, C., Matsuba, M. (1984) Effect of adrenaline on steroidogenesis in primary cultured bovine adrenocortical cells, *Jpn. J. Pharmacol.* 36, 35-41.
211. Dupré-Aucouturier, S., Penhoat, A., Rougier, O., Bilbaut, A. (2002) ACTH-induced Cl<sup>-</sup> current in bovine adrenocortical cells: correlation with cortisol secretion, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282, E355-E365.
212. Steffgen, J., Rohrbach, S., Beéry, E., Ersoy, D., Jarry, H., Metten, M., Bornstein, S. R., Müller, G. A. & Burckhardt, G. (1999) Demonstration of a Probenicid-inhibitable anion exchanger involved in the release of cortisol and cAMP and in the Uptake of p-Aminohippurate in bovine adrenocortical cells, *Cell Physiol Biochem.* 9, 72-80.
213. Rainey, W. E., Bird, I.M., Mason, J.I. (1994) The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies, *Mol Cell Endocrinol.* 100, 45-50.
214. Schimmer, B. P. (1980) Cyclic nucleotides in hormonal regulation of adrenocortical function, *Adv Cyclic Nucleotides Res.* 13, 181-214.

215. Mutschler, E. (1991) Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
  
216. Bauer, N. (2001) Das bei körperlicher Belastung gesunder Beagle-Hunde freigesetzte endogene Herzglykosid Ouabain steht unter der Kontrolle von Angiotensin II und Adrenalin, Dissertationsschrift am Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Germany, Giessen.
  
217. Laredo, J., Shah, J., Hamilton, B., Hamlyn, J.M. (1999) Biosynthesis and secretion of endogenous ouabain by human and bovine adrenocortical cells: role of ACTH, AngiotensinII and alpha adrenergic receptors in IXth International Conference On The Na/K-ATPase & Related ATPases, Excerpta Medica International Congress Series, Sapporo, Japan.
  
218. Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Komani, T., Hori, R. (1992) Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone, Journal of biological chemistry. 267, 24248-24252.
  
219. Dupré-Aucouturier, S., Penhoat, A., Rougier, O., Bilbaut, A. (2002) ACTH-induced Cl<sup>-</sup> current in bovine adrenocortical cells: correlation with cortisol secretion., Am J Physiol Endocrinol Metab. 282, E355-E365.
  
220. Steffgen, J., Rohrbach, S., Beéry, E., Ersoy, D., Jarry, H., Metten, M., Bornstein, S.R., Müller, G.A. und Burckhardt, G. (1999) Demonstration of a Probenicid-inhibitable anion exchanger involved in the release of cortisol and cAMP and in the Uptake of p-Aminohippurate in bovine adrenocortical cells, Cell Physiol Biochem. 9.
  
221. Litwack, G. & Schmidt, T. J. (1997) Biochemistry of Hormones II: Steroid Hormones in Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations (Devlin, T. M., ed) pp. 893-918, Wiley-Liss, New York.
  
222. Guillemette, G., Baukal, A.J., Balla, T., Catt, K.J. (1987) Angiotensin-induced formation and metabolism of inositol polyphosphates in bovine adrenal glomerulosa cells, Biochemical and Biophysical research communications. 142, 15-22.
  
223. Labhart, A. (1974) Clinical Endocrinology Theory and Practice, pp. 1830-1841, Schweiz, med. Wschr., Zürich.
  
224. Doris, P. A., Jenkins, L.A., Stocco, D.M. (1994) Is ouabain an authentic endogenous mammalian substance derived from adrenal gland? Hypertension. 23, 632-638.

225. Erdmann, E. & Schoner, W. (1974) Oubain-Receptor Interactions in ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase Preparations. IV. The Molecular Structure of Different Cardioactive Steroids and other Substances and Their Affinity to the Glycoside receptor, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 335-356.
  
226. Kochsiek, K. (1986) Importance of serum glycoside concentrations in Cardiac Glycosides 1785-1985, Biochemistry-Pharmacology-Clinical Relevance (Erdmann, E., Greef, K. & Skou, J. C., ed) pp. 407-416, Springer-Verlag, New York.
  
227. Bauer, N., Müller-Ehmsen, J., Krämer, U., Hambarchain, N., Zobel, C., Schwinger, R.H.G., Neu, H., Kirch, U., Grünbaum, E.-G., Schoner, W. (2005) Endogenous ouabain rises rapidly upon physical exercise in man and dog-effects of  $\beta$ -blockade and ACE-inhibition, Hypertension. 45, 1024-1028.
  
228. Hansen, O. (1984) Interaction of cardiac glycosides with ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy., Pharmacol. Rev. 36, 143-163.
  
229. Chen, W., Yen, T., Chang, M., Peng, I. (1969) Urinary excretion of norepinephrine of normal Chinese, hypertension and pheochromocytoma, Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi. 68, 666-71.
  
230. Kau, M. M., Lo, M.J., Tsai, S.C., Chen, J.J., Chiao, Y.C., Yeh, J.Y., Lin H., Shum, A.Y., Fang, V.S., Ho, L.T., Wang, P.S. (1999) Inhibition of aldosterone production by testosterone in male rats, Metabolism. 48, 1108-14.
  
231. Lin, H., Wang, S. W., Tsai, S. C., Chen, J. J., Chiao, Y. C., Lu, C. C., Huang, W. J., Wang, G. J., Chen, C. F. & Wang, P. S. (1998) Inhibitory effect of digoxin on testosterone secretion through mechanisms involving decreases of cyclic AMP production and cytochrome P450 $\text{sc}$  activity in rat testicular interstitial cells, Br J Pharmacol. 125, 1635-40.



Herrn Prof. Dr. E. Petzinger möchte ich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit danken. Es hat seinen mühsamen Sinn, aber es hat seinen Sinn, wenn man ein Projekt von grundauf neu beginnt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Schoner, der mir für alle Probleme methodischer und theoretischer Art, im Labor und am Computer, stets Ansprechpartner, Ratgeber, Richtungsweiser und Lehrer war. Wenn man von 100 gefundenen Rätseln 3 löst, so hat man 300% mehr erkannt als wenn man nie ein Rätsel gesucht hätte. Allzu oft aber war es amüsant, welche Begründungen als Erklärung dann doch wieder nichts taugten und uns stattdessen neue Rätsel aufgaben.

Ebenso möchte ich Frau Kirch danken, die mir bei der Etablierung und Optimierung des ELISA-Verfahrens half und mir in großer Menge das selbst-synthetisierte Ouabain-Antigen und den Ouabain-Antikörper zur Verfügung stellte.

Für die mir geleistete technische Hilfe möchte ich mich besonders bei Herrn K. Stumpf und Herrn K. Schuh bedanken und gleichzeitig nicht wissen, wie oft Herr K. Schuh in seinen Träumen mit roten Kulturflaschen in rotem Zellkulturmedium ertrunken ist.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Silke Neumann, die mir den Einstieg in die Laborarbeit und in die Präparationsmethode ermöglichte und mich peinlich genau dazu erzog, alles im Labor Befindliche zu beschriften. Bei der Vielzahl an Proben war das der einzig vernünftige Weg.

Herzlich bedanken möchte ich ebenfalls bei Dorothee von Schnakenburg, die mich sehr hilfreich in allen Papierkriegen unterstützte und bei unvorhergesehenen Ereignissen immer eine Lösung zur Hand hatte.

Frau Dr. Thorius-Ehrler aus dem staatlichen Amt für Lebensmittelüberwachung, Tierschutz und Veterinärwesen in Giessen und ihren Mitarbeitern möchte ich dafür danken, dass Sie mir die Rinder-Nebennieren zur Verfügung stellten, besonders dabei Herrn Gerald Keller, der unermüdlich und vorausschauend eine sehr gleichmäßige Auswahl traf.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. N. Katz und seinen Mitarbeiterinnen, Frau Nord und Frau Büttner, aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie an den Universitätskliniken der JLU Giessen, die in zahlreichen Proben Cortisol-Konzentrationen bestimmten.

Ganz herzlich möchte ich meinen Eltern und Großeltern danken, die mich mit aller Kraft unterstützten. Immer hatten sie ein offenes Ohr für meine Sorgen und ebenso freuten sich

somit gleich vier wichtige Menschen über jeden gelungenen Versuch. Gleiches gilt für den Mann an meiner Seite von [www.baerentours.com](http://www.baerentours.com), der mir vor allem in der Endphase meiner Arbeit sehr viel Kraft und Zuversicht schenkte und nicht müde wurde mir das Ziel vor Augen zu halten, unser Ziel.

Niemand hat sich mehr gewundert über diese Welt der Wissenschaft, die aus dem Nichts anscheinend doch so viel Wissen schafft.

Mein Dank gilt auch meinen Freunden und Bekannten Christian, Monika, Jörg, Peter, Andreas, Ralf, Ingo, Udo, Sandra und Marc, Dagmar und Matthias, die mir mit Ratschlägen zur Seite standen oder mit denen ich die „labor-ferne“ Zeit so sehr genossen habe.

Spiek und Oog gehörten als schärfste Kritiker jedes Vortrages ebenso mit dazu und natürlich Ulla; alle drei Vierbeiner zeigten durch Ihre eigenen z.T. rätselhaften Erkrankungen auf, warum die Veterinärmedizin wichtig ist und dass es bei all den offenen Fragen auf so vielen Gebieten unbedingt notwendig ist, weiter zu machen.

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Promotionsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekulare Veterinärmedizin“.